

HELENARA DOS SANTOS BECKEL

Resistência de populações de *Oryzaephilus surinamensis* (L.)
(Coleoptera: Silvanidae) a inseticidas piretróides e
organofosforados, em trigo armazenado


Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do
grau de Doutor, pelo Curso de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas, Área de Entomologia, do Setor de
Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.
Orientação: Prof^a Dr^a Sonia Maria Noemberg Lazzari
Dr. Irineu Lorini

Curitiba
2004

HELENARA DOS SANTOS BECKEL

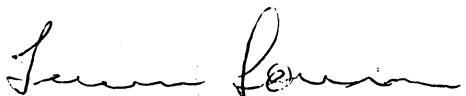
"Estudo da Resistência do *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae) a inseticidas piretróides e organofosforados em trigo armazenado."

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de "Doutor em Ciências", no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



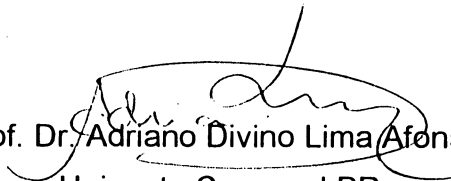
Profa. Dra. Sonia Maria Noemberg Lazzari (Orientadora)

UFPR



Dr. Irineu Lorini

Embrapa/Trigo Passo Fundo RS



Prof. Dr. Adriano Divino Lima Afonso

Unioeste Cascavel PR



Dra. Nádia Canali Langaro

Embrapa/Trigo Passo Fundo RS



Prof. Dr. Aírton Rodrigues Pinto Júnior

PUC/PR

Curitiba, 27 de fevereiro de 2004.

Este trabalho foi realizado mediante o convênio existente entre a Universidade Federal do Paraná e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (Embrapa cod. 10200.88/005-1).

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª Dr^ª Sonia M. N. Lazzari e ao Dr. Irineu Lorini, pela orientação, apoio e amizade no decorrer desta pesquisa.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Trigo, pela cessão dos Laboratórios de Entomologia, Qualidade e Biotecnologia, material biológico, e equipamentos utilizados durante o trabalho.

Aos técnicos, funcionários e estagiários da Embrapa Trigo, Egídio, Sérgio, Geraldo, Rafael, Alexandra, e em especial, a Nereide de Almeida, pelo carinho e colaboração na realização dos experimentos.

Aos pesquisadores da Embrapa Trigo, Sandra Patussi Bramer, Edson Iorczeski, e, em especial, a bolsista recém-doutor, Nadia Canali Lângaro, pelo apoio concedido.

Aos professores e funcionários do Departamento de Zoologia, da Universidade Federal do Paraná, pelos ensinamentos transmitidos, amizade e incentivo.

A todos os colegas do Curso de Pós-Graduação em Entomologia da UFPR, e, em especial, a Andreia Mauruto Chernaki Leffer, pelo carinho, companheirismo e amizade.

Aos meus familiares, pelo estímulo, carinho e atenção que sempre me dedicaram.

A Mateus Vieira, pelo incentivo e compreensão durante a realização do Curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

ÍNDICE

	Página
Agradecimentos	iii
Índice	iv
Resumo	vii
Abstract	viii
Introdução Geral	1
Bibliografia	8
 Capítulo 1 - Técnica para a multiplicação de <i>Oryzaephilus surinamensis</i> (L.) (Coleoptera: Silvanidae) em trigo, em laboratório	 16
Resumo	16
Abstract	16
1.1 Introdução	17
1.2 Material e Métodos	19
1.2.1 População de insetos	19
1.2.2 Método de multiplicação dos insetos	19
1.2.3 Longevidade de <i>O. surinamensis</i>	20
1.3 Resultados e Discussão	21
1.3.1 Método de Multiplicação	21
1.3.2 Ciclo Biológico	23
1.3.3 Longevidade	27
1.4 Referências Bibliográficas	30

Capítulo 2 - Detecção da resistência de <i>Oryzaephilus surinamensis</i> (L.) (Coleoptera: Silvanidae) a inseticidas organofosforados e piretróides	34
Resumo	34
Abstract	34
2.1 Introdução	35
2.2 Material e Métodos	37
2.2.1 Populações de <i>O. surinamensis</i>	37
2.2.2 Bioensaios para avaliação da resistência	38
2.2.3 Avaliação dos dados e análise estatística.....	39
2.3 Resultados e Discussão	40
2.4 Referências Bibliográficas	52
 Capítulo 3 - Efeito do sinergista butóxido de piperonila na resistência de <i>Oryzaephilus surinamensis</i> (L.) (Coleoptera: Silvanidae)	 55
Resumo	55
Abstract	55
3.1 Introdução	56
3.2 Material e Métodos	62
3.2.1 Populações de <i>O. surinamensis</i>	62
3.2.2 Sinergista e bioensaios	62
3.2.3 Avaliação dos dados e análise estatística	63
3.3 Resultados e Discussão	64
3.3.1 Fenitrotiom + Butóxido de Piperonila	64
3.3.2 Deltametrina + Butóxido de Piperonila	65
3.4 Referências Bibliográficas	69

Capítulo 4 - Expressão de RNA em populações resistentes e suscetíveis de <i>Oryzaephilus surinamensis</i> (L.) (Coleoptera: Silvanidae) em resposta ao inseticida fenitrothion	78
Resumo	78
Abstract	78
4.1 Introdução	79
4.2 Material e Métodos	82
4.2.1 Populações de <i>O. surinamensis</i> e bioensaio de resistência	82
4.2.2 Isolamento do RNA total	83
4.2.3 Testes de RNA	84
4.2.3.1 Transcrição reversa de RNA-PCR	85
4.2.3.2 Eletroforese de produtos de RT-PCR	85
4.2.4 Extração e amplificação de produtos de RT-PCR	86
4.2.5 Clonagem, isolamento de plasmídeo e sequenciamento	86
4.3 Resultados e Discussão	87
4.4 Referências Bibliográficas	94
Considerações finais	99
Anexo	102

RESUMO

A espécie *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae) ocorre, praticamente, em todas as unidades armazenadoras, causando a deterioração e contaminação dos grãos. Os inseticidas protetores usados para o controle desta espécie têm apresentado eficiência reduzida, sugerindo o desenvolvimento de resistência, cuja avaliação foi o objetivo geral desta pesquisa. Doze populações de *O. surinamensis*, designadas como OS1 a OS13, provenientes de diferentes localidades da região sul do Brasil, foram estudadas para verificar sua resposta ao inseticida organofosforado fenitrotiom e pirimifós-metil e aos piretróides deltametrina e bifentrina. Inicialmente, procedeu-se à multiplicação de *O. surinamensis*, usando grãos de trigo triturados em diferentes graus, a fim de otimizar a reprodução e possibilitar a investigação da resistência. A dieta de grãos de trigo triturados ao grau 20 produziu a maior quantidade de progênie e foi adotada para a criação da espécie. Os resultados de avaliação da resistência aos inseticidas, mediante bioensaios de impregnação de papel filtro com diferentes concentrações de inseticida indicaram a ocorrência de uma população suscetível, OS1, e duas resistentes, OS12 e OS10, ao inseticida fenitrotiom, e de uma população suscetível, OS13, e duas resistentes, OS3 e OS10, à deltametrina. A população OS1 foi considerada suscetível para os inseticidas pirimifós-metil e bifentrina, e as populações OS4 e OS2, respectivamente, apresentaram níveis de resistência maiores. As demais populações apresentaram níveis de resistência intermediários aos inseticidas. O sinergista butóxido de piperonila (PBO), usado para investigar os mecanismos de resistência, aumentou significativamente a toxicidade de deltametrina nas populações resistentes, indicando que as oxidases exercem uma importante função na resistência a esse inseticida. Como a resistência não foi completamente suprimida, possivelmente outros mecanismos, além do metabolismo por oxidases, podem estar envolvidos com o processo em *O. surinamensis*. Para o fenitrotiom, o sinergista apresentou um efeito antagonista, diminuindo significativamente a toxicidade do inseticida em todas as populações testadas, indicando que PBO não é o sinergista mais apropriado para compostos organofosforados. O estudo pela técnica da expressão diferencial do RNA, sequenciando-se fragmentos do cDNA, indicou diferenças significativas na expressão de genes entre a população suscetível, OS1, e a resistente OS10, sugerindo que houve uma adaptação genética nos indivíduos resistentes. Estas informações representam uma contribuição importante para estudos futuros que abordem a estrutura genética das populações de *O. surinamensis* e de outras pragas, para esclarecer os mecanismos envolvidos na resistência a inseticidas.

ABSTRACT

The saw-toothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae), occurs in almost all storage facilities, causing severe grain damage. Protectant insecticides presents low control efficiency, suggesting the development of resistance, which was the aim of this research. Twelve *O. surinamensis* strains, designated as OS1 to OS13, from different localities of southern Brazil, were studied to evaluate their resistance to the organophosphorous insecticides fenitrothion and pirimiphos-methyl and to the pyrethroids deltamethrin and bifenthrin. Initially, a laboratory rearing method using wheat kernels milled at different grades was performed to produce the insects for the resistance tests. The kernels milled at grade 20 produced the highest number of offspring and this substrate was adopted to rear the species. The results of bioassays using impregnated filter paper with different insecticide concentrations showed that the strain OS1 was susceptible, while OS12 and OS10 were resistant to fenitrothion. For deltamethrin, strain OS13 was susceptible, while OS3 and OS10 were resistant. The OS1 strain was considered susceptible to pirimiphos-methyl and bifenthrin insecticides; on the other hand and OS4 and OS1 strains, showed higher resistance level to those insecticides, respectively. The other strains showed intermediate resistance. The synergist piperonyl butoxide (PBO) used to investigate the resistance mechanisms increased deltamethrin toxicity significantly for the resistant strains, indicating that oxidases play an important role in deltamethrin resistance. However, as this procedure failed to completely suppress resistance, possibly others mechanisms, besides oxidases metabolism, may be involved in resistance for *O. surinamensis*. To fenitrothion, PBO showed antagonistic effect, reducing insecticide toxicity significantly, indicating that this synergist is not appropriate for organophosphorous compounds. The study using the differential display of RNA technique (DD-RNA) indicated significant difference in the differential display of genes between the susceptible strain, OS1, and the resistant, OS10, suggesting that there was a genetic adaptation in resistant individuals. This information represents an important contribution future studies in order to understand the genetic structure of *O. surinamensis* populations and of other pests and to help to clarify the mechanisms involved with insecticide resistance.

INTRODUÇÃO GERAL

O consumidor, cada vez mais consciente de sua importância dentro das relações mercadológicas modernas, exerce com naturalidade seus direitos sobre os produtos e serviços que adquire, exigindo competência, qualidade técnica e inovação tecnológica (Ota *et al.*, 2002). Como resposta, o setor alimentício tem tentado atender aos anseios do consumidor, investindo em tecnologia e na qualidade dos produtos (Ota *et al.*, 2002).

A produção brasileira de grãos já ultrapassa o patamar de 100 milhões de toneladas ao ano, estabelecido, principalmente, pelo incremento na produtividade e, em parte, pela agregação de área. Entretanto, um dos segmentos da cadeia agroalimentar, especificamente o setor de armazenagem de grãos, não vem correspondendo às expectativas e, inevitavelmente, necessita incrementar suas condições de armazenamento, principalmente no que diz respeito aos métodos de controle de pragas.

Em 1993 as perdas quantitativas médias causadas por pragas durante o armazenamento de grãos no Brasil, estimadas pela FAO e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento brasileiro, foram de aproximadamente 10,0% do total produzido anualmente (Brasil, 1993). Atualmente, as perdas podem variar muito entre pequeno e grande produtor, mas ainda representam um importante problema que deve ser solucionado.

As pragas de produtos armazenados ocorrem em todo o mundo, causando sérias perdas quando não são implementadas medidas de controle adequadas. Diversos inseticidas podem ser usados por diferentes métodos de aplicação, mas nem sempre são totalmente eficientes para exterminar todas as pragas ou para evitar a re-infestação, de modo que os indivíduos remanescentes podem resultar em problemas de resistência (Lorini, 1997).

Fatores como instalações de armazenamento inapropriadas (Padilha & Faroni, 1993; Lorini, 2001) e condições de umidade tropical (Padilha & Faroni, 1993; Obeng-ofori, 1995) acentuam as perdas nos armazéns. Entretanto, um dos principais problemas existentes no setor de armazenagem é o uso inadequado de inseticidas ou mistura de inseticidas para combater infestações de pragas, bem como o despreparo dos aplicadores. Existem muitas recomendações para controlar pragas em grãos armazenados, as quais variam com a eficácia de cada inseticida para cada espécie, e com a estratégia adotada em sua aplicação para prevenir a resistência (Faroni, 1993; Padilha & Faroni, 1993; Lorini, 2001).

Devido às grandes perdas provocadas pelos insetos nos armazéns, o uso de produtos químicos foi intensificado, tanto como forma preventiva, quanto curativa (Padilha & Faroni, 1993). Inseticidas residuais são usados pelos armazenadores em pulverizações diretamente sobre os grãos, ou mesmo na superfície de pilhas de sacos e cargas de grãos (Collins *et al.*, 1988; 1993; Jembere *et al.*, 1995; Collins & Binns, 1996; Prates *et al.*, 1998; Rahim, 1998).

A forma indiscriminada como as substâncias químicas de controle têm sido utilizadas, resultam em graves problemas, como a seleção de populações resistentes aos inseticidas; ocorrência de resíduos químicos nos grãos após os tratamentos (Bengston *et al.*, 1983; Arthur, 1992; Hidalgo *et al.*, 1998; Rahim, 1998) e complicações legais e comerciais (Padilha & Faroni, 1993). Outro fator agravante é que, enquanto se dispõe de dezenas, e até centenas, de ingredientes ativos para o controle das pragas na lavoura, para as pragas de armazenamento há poucos inseticidas registrados e comercializados (Picollo de Villar *et al.*, 1992; Lorini, 2001).

A espécie *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae) é cosmopolita (Pierce *et al.*, 1990), representando uma das pragas secundárias mais sérias

que infestam grãos armazenados em todo o mundo (Armstrong & Howe, 1963; Champ & Dyte, 1976; Attia & Frecker, 1984; Collins, 1985; Collins *et al.*, 1989; Bell, 1991; Beckett & Evans, 1994; Beckett *et al.*, 1996; Nakajima *et al.*, 1996). Populações da praga têm desenvolvido resistência aos inseticidas malatíon, fenitrotion, clorpirifós-metil e pirimifós-metil em vários países (Brun & Attia, 1983; Herron, 1990; Collins *et al.*, 1993).

No Brasil, *O. surinamensis* aparece praticamente em todas as unidades armazenadoras, onde causa a deterioração de grãos (Lorini, 2001). Entretanto, não existe registro de resistência desta espécie aos quatro inseticidas registrados para o controle dessa espécie no país, dois organofosforados: fenitrotion e pirimifós-metil e dois piretróides: deltametrina e bifentrina. Esta informação, é essencial para o manejo integrado da praga, sendo um dos mais importantes assuntos a serem entendidos e colocados em prática, uma vez que é muito difícil o controle depois que uma espécie se torna resistente a um princípio ativo.

Segundo Omoto & Guedes (1998), a evolução da resistência de pragas a inseticidas tem-se tornado um dos grandes entraves em programas de controle de pragas envolvendo o uso de produtos químicos. Segundo Georgiou (1983), desde o primeiro registro de resistência a inseticidas, por Melander, em 1914, esta passou a representar uma grande desvantagem dos inseticidas com relação a outros métodos de controle. O interesse em resistência foi intensificado com a introdução do DDT e com o rápido desenvolvimento de casos de resistência a organoclorados, organofosforados, carbamatos, e mais recentemente aos piretróides. Desde então, significativos avanços têm sido feitos para o conhecimento da resistência genética, fisiológica e bioquímica, mas o progresso foi pequeno com relação a medidas práticas para retardar sua evolução (Georgiou, 1983), já que vários elementos podem estar envolvidos no processo.

A taxa de evolução de resistência em populações de pragas pode ser influenciada por fatores como: o número de loci que controlam a resistência (Uyenoyama, 1986; Via, 1986; Tabashnik, 1990), seu grau de dominância, o qual é variável, dependendo da concentração do inseticida (Taylor & Georgiou, 1979), a frequência inicial em uma população e a aptidão relativa de genótipos na presença e ausência de inseticidas (Muggleton, 1983), e o grau de migração e fluxo de genes (Guedes *et al.*, 1997).

Um requisito muito importante para iniciar estudos de resistência de insetos a inseticidas é a adoção de uma metodologia de criação da espécie em questão, já que a disponibilidade desses insetos em número suficiente e durante todo o ano é fundamental para que as pesquisas sejam desenvolvidas sem interrupção. Também, é fundamental o conhecimento da biologia do inseto, o qual permitirá antecipar o número de gerações que determinada espécie produz ao longo de um ano. E, além dessa informação, o estudo da biologia permite padronizar a idade dos insetos que serão utilizados em testes para a verificação da resistência.

Segundo Campbell & Sinha (1976), as espécies mais vorazes, *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera, Bostrichidae) e *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera, Curculionidae), aumentam 50 vezes ao mês o tamanho da população, sob condições ótimas de temperatura e umidade relativa do ar; já *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) (Coleoptera, Cucujidae) aumenta 60 vezes ao mês. Essas informações associadas ao histórico da evolução de resistência a inseticidas são necessárias para o manejo, pois, a magnitude do problema de resistência pode agravar-se com o aumento do tamanho da população.

Segundo Uyenoyama (1986), o processo de adaptação que ocorre em pragas de produtos armazenados envolve, além da extraordinária intensidade de seleção imposta, a sofisticação de mecanismos genéticos para a indução e repressão coordenadas de

enzimas catabólicas. A seleção prolongada resulta no refinamento de respostas que permitem a sobrevivência naquele ambiente, pois, envolve enzimas capazes de metabolizar os ingredientes ativos. Segundo Uyenoyama (1986) indução, taxas maiores de atividade e maior especificidade melhoram a operação da nova rota metabólica.

Adicionar um sinergista a um inseticida é uma alternativa, em laboratório, para solucionar a resistência, já que os sinergistas bloqueiam as enzimas que conferem resistência. Eles podem também ser usados para reduzir a concentração letal requerida para controlar as pragas por melhorar a toxicidade do inseticida e então reduzir os resíduos nos grãos. Entretanto, nem todas as espécies podem ser controladas pela adição de sinergistas (Bengston *et al.*, 1983; Bengston *et al.*, 1984; Samson *et al.*, 1990; Hinks & Spurr, 1991).

O sinergista butóxido de piperonila é um dos mais comuns adicionados a piretróides, principalmente para melhorar a eficácia e reduzir resíduos (Daglish *et al.*, 1995). Este sinergista inibe principalmente enzimas oxidases que causam mais comumente resistência a piretróides (Hinks & Spurr, 1991). Como enzimas estão envolvidas na detoxificação de inseticidas, investigações bioquímicas nessa área podem ajudar a encontrar o melhor caminho para minimizar o problema de resistência em certas espécies.

Para uma melhor compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos no desenvolvimento de resistência, o emprego de técnicas bioquímicas e moleculares podem ser úteis para detecção de genes de resistência em insetos, a fim de fomentar programas de manejo da resistência (Field *et al.*, 1989).

Segundo Fournier *et al.*, (1992), embora a resistência de insetos a inseticidas seja um importante problema agrícola porque reduz a eficiência dos tratamentos, este fenômeno fornece um bom modelo de adaptação de eucariontes a ambientes tóxicos.

Até bem pouco tempo atrás, a origem genética da resistência a inseticidas vinha recebendo pouca atenção e, apesar de ainda não ser significativamente utilizada, a análise genética tem demonstrado ser um método útil para resolver vários problemas, como distinguir diferenças nos mecanismos envolvidos na resistência aos diferentes inseticidas (Tsukamoto, 1983).

Novas técnicas têm sido recentemente descritas, destacando-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), para amplificar regiões arbitrárias de um genoma. A técnica permite a análise de polimorfismos genéticos em pequenos artrópodos (Black, 1993).

Segundo Williams *et al.* (1990), mapas genéticos incluindo marcadores de DNA também são úteis para análises de genomas. Marcadores de DNA que são geneticamente ligados a características de interesse podem ser usados para clonagem de genes e para incorporar características em melhoramento de plantas e animais. Os marcadores de DNA mais comumente usados são RFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição) e RAPD (Amplificação ao Acaso de DNA Polimórfico).

O estudo do RNA tem sido pouco utilizado para a verificação de resistência de insetos a inseticidas, contudo, pode ser extremamente útil para esta finalidade, pois, permite verificar a expressão de genes frente a um tratamento. As células expressam em torno de 15.000 genes e, a princípio, cada molécula de mRNA pode ser transcrita reversamente pela PCR (*“reverse transcription polymerase chain reaction”* - RT-PCR). A expressão diferencial do RNA (*“differential display” of RNA* – DD-RNA) (Liang *et al.*, 1992) é uma metodologia utilizada com o propósito de identificar a expressão diferencial de genes de diversos sistemas eucariontes. Por este método, os fragmentos (cDNAs) são amplificados pela PCR e, resolvidos em gel de sequenciamento. É uma

tecnologia de “*fingerprinting*” que facilita a identificação de mRNAs nas células ou tecidos, sendo útil para a identificação de alterações de funções das células resultantes de diferenças na transcrição ou na degradação do mRNA.

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a resistência de populações de *O. surinamensis* aos inseticidas piretróides e organofosforados e apresenta os seguintes estudos específicos:

- a) Determinar uma técnica de criação estoque de *O. surinamensis*, em laboratório, para possibilitar a investigação da resistência a inseticidas e outros estudos;
- b) Detectar, mediante bioensaios, a resistência em populações de *O. surinamensis* coletadas em unidades armazenadoras;
- c) Determinar o efeito do sinergista butóxido de piperonila (PBO) na supressão da resistência de *O. surinamensis*;
- d) Avaliar a resistência a inseticidas em populações de *O. surinamensis*, utilizando técnicas moleculares.

Bibliografia

- Armstrong, M.T. & Howe, R.W. (1963) The saw-toothed grain beetle (*Oryzaephilus surinamensis*) in home-grown grain. *Journal of Agricultural Engineering Research* **8**, 256-261.
- Arthur, F.H. (1992) Control of lesser grain borer (Coleoptera: Bostrichidae) with chlorpyrifos-methyl, bioresmethrin, and resmethrin: effect of chlorpyrifos-methyl resistance and environmental degradation. *Journal of Economic Entomology* **85**, 1471-1475.
- Attia, F.I. & Frecker, T. (1984) Cross-resistance spectrum and synergism studies in organophosphorus-resistant strains of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Cucugidae) in Australia. *Journal of Economic Entomology* **77**, 1367-1370.
- Beckett, S.J. & Evans, D.E. (1994) The demography of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae) on Kibbled wheat. *Journal of Stored Products Research* **30**, 121-137.
- Beckett, S.J., Evans, D.E. & Morton, R. (1996) A comparison of the demographies of pesticide susceptible and resistant strains of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae) on kibbled wheat. *Journal of Stored Products Research* **32**, 141-151.

- Bell, C.H. (1991) Activity rhythms linked with foraging behaviour in insecticide-resistant and susceptible strains of *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae). *Journal of Stored Products Research* **27**, 171-177.
- Bengston, M., Davies, R.A.H., Desmarchelier, J.M., Henning, R., Murray, W., Simpson, B.W., Snelson, J.T., Sticka, R. & Wallbank, B.E. (1983) Organophosphorothioates and synergised synthetic pyrethroids as grain protectants on bulk wheat. *Pesticide Science* **14**, 373-384.
- Bengston, M., Davies, R.A.H., Desmarchelier, J.M., Phillips, M.P. & Simpson, B.W. (1984) Organophosphorus and synergised synthetic pyrethroid insecticides as grain protectants for stored sorghum. *Pesticide Science* **15**, 500-508.
- Black, W.C. (1993) PCR with arbitrary primers: approach with care. *Insect Molecular Biology* **2**, 1-6.
- Brasil (1993) Perdas na agropecuária brasileira: relatório preliminar. **1**, Comissão Técnica para Redução das Perdas na Agropecuária (Brasília, DF). Brasília.
- Brun, L.O. & Attia, F.I. (1983) Resistance to lindane, malathion and fenitrothion in coleopterous pests of stored products in New Caledonia. *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society* **24**, 211-215.
- Campbell, A. & Sinha, R.N. (1976) Damage of wheat by feeding of some stored product beetles. *Journal of Economic Entomology* **69**, 11-13.

- Champ, B.R. & Dyte, C.E. (1976) *Informe de la prospeccion mundial de la FAO sobre susceptibilidad a los insecticidas de las plagas de granos almacenados*. 356 pp. Roma.
- Collins, D.A. & Binns, T.J. (1996) Efficacy of surface dust treatments of pirimiphos-methyl and etrimfos when applied to commercially stored wheat and barley. *Pesticide Science* **47**, 61-67.
- Collins, P.J. (1985) Resistance to grain protectants in field populations of the sawtoothed grain beetle in Southern Queensland. *Aust. J. Exp. Agric.* **25**, 683-686.
- Collins, P.J., Lambkin, T.M., Bridgeman, B.W. & Pulvirenti, C. (1993) Resistance to grain-protectant insecticides in coleopterous pests of stored cereals in Queensland, Australia. *Journal of Economic Entomology* **86**, 239-245.
- Collins, P.J., Mulder, J.C. & Wilson, D. (1989) Variation in life history parameters of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae). *Journal of Stored Products Research* **25**, 193-199.
- Collins, P.J., Sinclair, E.R., Howitt, C.J. & Haddrell, R.L. (1988) Dispersion of grain beetles (Coleoptera) in grain partially treated with insecticide. *Journal of Economic Entomology* **81**, 1810-1815.
- Daglish, G.J., Eelkema, M. & Harrison, L.M. (1995) Chlorpyrifos-methyl plus either methoprene or synergized phenothrin for control of coleoptera in maize in Queensland, Australia. *Journal of Stored Products Research* **31**, 235-241.

- Faroni, L.R.D. (1993) Resistência de pragas de grãos armazenados a inseticidas. In *SIMPÓSIO DE PROTEÇÃO DE GRÃOS ARMazenADOS, 1993, Passo Fundo*, ed. Embrapa - Cnpt, pp. 44-51. EMBRAPA - CNPT, Passo Fundo.
- Field, L.M., Devonshire, A.L., FFrench-Constant, R.H. & Forde, B.G. (1989) The combined use of immunoassay and a DNA diagnostic technique to identify insecticide-resistant genotypes in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulz.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **34**, 174-178.
- Fournier, D., Bride, J.-M., Hoffmann, F. & Karch, F. (1992) Acetylcholinesterase - two types of modifications confer resistance to insecticide. *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 14270-14274.
- Georghiou, G.P. (1983) Management of resistance in arthropods. In *Pest resistance to pesticides: challenges and prospects.*, ed. G. P. Georghiou & T. Saito, pp. 769-792. Plenum Press, New York, United States of America.
- Guedes, R.N.C., Kambhampati, S. & Dover, B.A. (1997) Allozyme variation among Brazilian and U.S. populations of *Rhyzopertha dominica* resistant to insecticides. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **84**, 49-57.
- Herron, G.A. (1990) Resistance to grain protectants and phosphine in coleopterous pests of grain stored on farms in New South Wales. *Journal of the Australian Entomological Society* **29**, 183-189.

- Hidalgo, E., Moore, D. & Le Patourel, G. (1998) The effect of different formulations of *Beauveria bassiana* on *Sitophilus zeamais* in stored maize. *Journal of Stored Products Research* **34**, 171-179.
- Hinks, C.F. & Spurr, D.T. (1991) The efficacy and cost benefits of binary mixtures of deltamethrin combined with other insecticides or synergists against grasshoppers at two temperatures. *J. Agric. Entomol.* **8**, 29-39.
- Jembere, B., Obeng-ofori, D., Hassanali, A. & Nyamasyo, G.N.N. (1995) Products derived from the leaves of *Ocimum kilimandscharicum* (Labiatae) as post-harvest grain protectants against the infestation of three major stored product insect pests. *Bulletin of Entomological Research* **85**, 361-367.
- Liang, P. & Pardee, A.B. (1992) Differential display of eukariotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967-971.
- Lorini, I. (1997) Insecticide resistance in *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrychidae), a pest of stored grain. London: University of London. Ph. D. Thesis. 166p.
- Lorini, I. (2001) *Manual Técnico para o Manejo Integrado de Pragas de Grãos de Cereais Armazenados*. 80 pp. Embrapa Trigo. Passo Fundo, RS.
- Muggleton, J. (1983) Relative fitness of malathion-resistant phenotypes of *Oryzaephilus surinamensis* L. (Coleoptera: silvanidae). *Journal of Applied Ecology* **20**, 245-254.

- Nakajima, S., Sugawara, K., Takeda, T., Tateishi, M., Okamura, A., Iwasa, J. & Baba, N. (1996) Arrestants to *Oryzaephilus surinamensis* L. from wheat flour infested by the same weevil. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 1546-1547.
- Obeng-ofori, D. (1995) Plant oils as grain protectants against infestations of *Cryptolestes pusillus* and *Rhyzopertha dominica* in stored grain. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **77**, 133-139.
- Omoto, C. & Guedes, R.N.C. *Curso: "Resistência de pragas a pesticidas: princípios e práticas"*, (1998)(UnPub)
- Ota, M.M., Toschi, C.C., Oliveira, S.S.C. & Antoniazzi, N. (2002) Exigências do mercado consumidor. In *Armazenagem de Grãos*, ed. I. Lorini, L. H. Miike & V. M. Scussel, pp. 899-959. Bio Geneziz, Campinas, SP.
- Padilha, L. & Faroni, L.R.D. (1993) Importância e formas de controle de *Rhyzopertha dominica* (F.) em grãos armazenados. In *SIMPÓSIO DE PROTEÇÃO DE GRÃOS ARMazenados, 1993, Passo Fundo*, ed. Embrapa - Cnpt, pp. 52-58. EMBRAPA - CNPT, Passo Fundo, RS.
- Piccollo de Villar, M., Ferrero, A., Seccacini, E. & Zerba, E. (1992) Perfil de toxicidad de insecticidas en cepas susceptibles y resistentes al malation en *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Revista de la Sociedad Entomologica Argentina* **51**, 1-4.

- Pierce, A.M., Borden, J.H. & Oehlschlager, A.C. (1990) Suppression of oviposition in *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Cucujidae) following prolonged retention in high-density cultures or short-term exposure to larval volatiles. *Journal of Chemical Ecology* **16**, 595-601.
- Prates, H.T., Santos, J.M., Waquil, J.M., Fabris, J.D., Oliveira, A.B. & Foster, J.E. (1998) Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Stored Products Research* **34**, 243-249.
- Rahim, M. (1998) Biological activity of azadirachtin-enriched neem kernel extracts against *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) in stored wheat. *Journal of Stored Products Research* **34**, 123-128.
- Samson, P.R., Parker, R.J. & Hall, E.A. (1990) Synergized deltamethrin as a protectant against *Sitophilus zeamais* Motsch. and *S. oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) on stored maize. *Journal of Stored Products Research* **26**, 155-161.
- Tabashnik, B.E. (1990) Implications of gene amplification for evolution and management of insecticide resistance. *Journal of Economic Entomology* **83**, 1170-1176.
- Taylor, C.E. & Georgiou, G.P. (1979) Suppression of insecticide resistance by alteration of gene dominance and migration. *Journal of Economic Entomology* **72**, 105-109.

Tsukamoto, M. (1983) Methods of genetic analysis of insecticide resistance. In *Pest Resistance to Pesticides: Challenges and Prospects*, ed. G.P.Georgiou & T.Saito, pp. 71-98. Plenum Press, New York, United States of America.

Uyenoyama, M.K. (1986) Pleiotropy and the evolution of genetic systems conferring resistance to pesticides. In *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management*, ed. National Research Council, pp. 207-221. National Academy Press, Washington, United States of America.

Via, S. (1986) Quantitative genetic models and the evolution of pesticide resistance. In *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management*, ed. National Research Council, pp. 222-235. National Academy Press, Washington, United States of America.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**, 6531-6535.

CAPÍTULO 1

TÉCNICA PARA A MULTIPLICAÇÃO DE *Oryzaephilus* *surinamensis* (L.) (COLEOPTERA: SILVANIDAE) EM TRIGO, EM LABORATÓRIO

Resumo – A espécie *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae) ocorre em números elevados em todas as unidades armazenadoras, causando a deterioração e contaminação dos grãos. O objetivo deste trabalho foi estabelecer, em laboratório, a multiplicação de *O. surinamensis*, usando grãos de trigo como substrato, a fim de otimizar a reprodução e permitir o controle de gerações necessárias à investigação da resistência a inseticidas. Os adultos, coletados em uma unidade armazenadora de grãos da região Sul do Brasil, foram retidos em peneira com malha 30, abertura 600 µm, e mantidos por dez dias em frascos de vidro contendo grãos de trigo triturados a diferentes graus. Após o período de cópula e oviposição, o meio foi peneirado para a remoção de todos os adultos. O número de ovos, larvas e pupas foi contado a intervalos de cinco dias até a geração seguinte de adultos, cuja longevidade foi avaliada. A dieta de grãos de trigo triturados ao grau 20 produziu a maior quantidade de progênie. Nesta dieta obteve-se 89,0 % de ovos ao quinto dia, 30,5 % de larvas ao décimo dia, 43,0 % de pupas ao trigésimo dia e 63,4 % de adultos ao quadragésimo sexto dia. A longevidade máxima dos adultos foi de 450 dias.

Palavras-chave - Coleoptera, *Oryzaephilus surinamensis*, criação massal, trigo armazenado

Abstract - *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae) has been found in high numbers in almost all storage facilities, causing severe grain damage. The objective of this research was to develop a laboratory rearing method on wheat grain to produce large population for resistance tests. The adults, collected from storage units in the southern region, were sieved through 30 mesh and aperture of 600 µm, and left for ten days inside jars with wheat kernels ground at different grades. After copulation and oviposition periods, the substrate was sieved to remove the adults. The number of eggs, larvae, and pupae was counted at five days intervals until the following adult generation, which longevity was also evaluated. The kernels ground at grade 20 produced the highest number of offspring, 89.0% of eggs at the fifth day, 30.5% of larvae at the tenth day, 43.0% of pupae at the 30th day and 63.4% of adults at the 46th day; the adults survived up to 450 days.

Keywords - Coleoptera, Saw-toothed grain beetle, mass rearing, stored wheat

1.1 Introdução

Oryzaephilus surinamensis (L.) (Coleoptera: Silvanidae) é uma das pragas de grãos armazenados mais significativas economicamente em todo o mundo (Champ & Dyte, 1976). Esta espécie é considerada uma praga secundária devido à sua incapacidade de atacar grãos inteiros, entretanto, as populações registradas e, conseqüentemente seus danos, têm sido elevados, principalmente devido à prática da colheita mecanizada, que resulta em fendas e rachaduras nos grãos, favorecendo o desenvolvimento deste inseto (Tuff & Telford, 1964; Howe, 1973).

No Brasil, *O. surinamensis* aparece praticamente em todas as unidades armazenadoras, onde causa a deterioração de grãos (Lorini, 2001). É um besouro pequeno e ativo e, uma vez introduzido em uma estrutura de armazenamento, invade rapidamente todas as fendas e rachaduras, formando focos de infestação, o que torna muito difícil controlá-lo (Howe, 1956).

Embora a biologia de *O. surinamensis* tenha sido estudada por vários autores, (Howe, 1956; 1965; Fleming, 1988; Collins *et al.*, 1989; Jacob & Fleming, 1989; Mason, 1996), há pouca informação sobre metodologias e condições necessárias para o desenvolvimento desta espécie visando sua criação massal para diversos estudos.

Sabe-se que a dieta fornecida a insetos de produtos armazenados, bem como as condições ambientais, influenciam o aumento da população. LeCato & McCRAY (1973), ao estudarem a multiplicação de *O. surinamensis* sobre diferentes tipos de alimentos, encontraram insetos adultos mortos quando colocados sobre amendoim, provavelmente pela elevada quantidade de óleo que cobriu seus corpos. Resultados de estudos de Thomas & Shepard (1940) demonstraram que o óleo de nozes moídas foi fatal para larvas de *O. surinamensis*. Segundo os autores, o desenvolvimento dos insetos sobre as nozes é mais prolongado porque estas são menos higroscópicas do que a aveia,

devido possivelmente ao seu alto conteúdo de óleo. Entretanto, Verner (1971), ao testar também diferentes tipos de alimentos, encontrou que nozes e sementes de girassol foram preferencialmente escolhidas por *O. surinamensis* ao invés de grãos de soja.

Em estudos de Howe (1956), a média do período de desenvolvimento larval de *O. surinamensis* aumentou de 12,5 dias sobre grãos de trigo para 31,8 dias sobre farinha de coco.

Segundo Sinha (1971), LeCato & McCRAY (1973) e Nakajima *et al.* (1996), *O. surinamensis* apresenta maior preferência alimentar por grãos de cereais. Fraenkel & Blewett (1943) ainda afirmam que esta espécie precisa de um fornecimento adequado de carboidratos para seu desenvolvimento.

Ainda, com relação à preferência alimentar, uma revisão feita por Kim & Smith (2000) indica que os insetos podem modificar seu padrão de alimentação sobre dietas ricas em carboidratos ou proteínas dependendo do nível de ambos na hemolinfa e, que a preferência pelo nutriente que está em falta deve persistir até que o alvo desejado seja restabelecido.

Estudos de Campbell & Sinha (1976), abordando a atividade alimentar de *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) (Coleoptera: Cucujidae), *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) e *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae), indicaram que adultos de *C. ferrugineus* alimentaram-se exclusivamente do germe de grãos de trigo, o qual é rico em vitaminas, enquanto as duas outras espécies consumiram o germe e o endosperma. Resultado semelhante foi encontrado por Tuff & Telford (1964) indicando que *C. ferrugineus* consumiu completamente o embrião.

Da mesma forma, *O. surinamensis* também apresenta exigências para consumir alimentos. Com relação à trituração de grãos de trigo, geralmente aceita-se que este inseto não pode viver em grãos inteiros armazenados sob condições ótimas, e que uma

quantidade maior de grãos quebrados fornecido como alimento favorece o aumento da população (Turney, 1957).

O objetivo geral desta pesquisa foi estabelecer uma metodologia de criação massal de *O. surinamensis*, em laboratório, visando otimizar a multiplicação desta espécie para estudos diversos. O ajuste da técnica de criação de *O. surinamensis* em laboratório é primordial para a obtenção destes insetos durante todo o ano para que as diversas pesquisas sejam desenvolvidas sem interrupção.

Outro objetivo proposto foi determinar o ciclo biológico de *O. surinamensis*, em laboratório, a fim de possibilitar a padronização da idade dos adultos utilizados em testes para a verificação da resistência genética aos inseticidas químicos usados para a proteção de grãos armazenados.

O terceiro objetivo foi investigar a longevidade de *O. surinamensis* e o efeito da dieta sobre a sobrevivência de adultos.

1.2 Material e Métodos

1.2.1 População de insetos

Insetos adultos foram coletados em uma unidade armazenadora de grãos da região Sul do Brasil, no município de Passo Fundo, RS, no ano de 1998, identificados como população OS1 e, desde a época da coleta, foram mantidos no Laboratório de Entomologia da Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS.

1.2.2 Método de multiplicação dos insetos

Para a multiplicação da espécie, foram avaliados cinco substratos de trigo de acordo com o grau de trituração do grão: 5, 9, 11 e 20, obtidos através do aparelho de

trituração Buhler-Miag, modelo MLI 204, 1988, do Laboratório de Qualidade da Embrapa Trigo, e grãos inteiros.

Os grãos de trigo foram esterilizados em estufa a 60°C por uma hora e mantidos em sala climatizada, à temperatura de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de $65 \pm 5\%$, por aproximadamente três horas, a fim de adquirirem as condições ideais para sua utilização.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, considerando os quatro tratamentos quanto ao grau de trituração e grãos inteiros, em quatro repetições. Foram liberados 100 insetos adultos, não sexados, com idade variável de 1-20 dias, da população OS1, em cada repetição. Os insetos foram obtidos por peneiramento (malha 30, abertura 600 μm) do meio de criação e colocados em frascos de vidro de 0,5 L, previamente esterilizados, contendo 80 g de grãos de trigo, e vedados com massa para calafetar e papel filtro. Os insetos permaneceram nos frascos por 10 dias para cópula e oviposição, à temperatura de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de $65 \pm 5\%$. Após os 10 dias todos os adultos foram removidos dos frascos, restando apenas a progênie.

A cada cinco dias o material dos frascos foi peneirado (malha 80, abertura 180 μm) para a observação de ovos, larvas, pupas e adultos, e os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

1.2.3 Longevidade de *O. surinamensis*

Após a obtenção dos primeiros adultos da progênie da população OS1, os insetos foram peneirados (malha 30, abertura 600 μm), retirados e colocados em novos frascos contendo os diferentes tipos de dieta a fim de investigar a longevidade.

O delineamento experimental foi semelhante ao anterior, sendo que em média 126,25 insetos adultos foram obtidos e liberados em cada repetição contendo grãos de trigo triturados ao grau 5; 128,75 para o grau 9; 143,75 para o grau 11; 199,50 para o grau 20 e 7,75 em grãos inteiros. O experimento foi mantido à temperatura de $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar de $65 \pm 5\%$.

A cada vinte dias, o material foi peneirado para a contagem e retirada dos insetos mortos e, os insetos vivos restantes foram colocados em novos frascos contendo os diferentes meios, a fim de evitar a sobreposição de gerações. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

1.3 Resultados e Discussão

1.3.1 Método de Multiplicação

O melhor resultado obtido para a multiplicação de *O. surinamensis* foi no meio de criação contendo grãos de trigo uniformemente triturados ao grau 20, de onde emergiram, em média 199,5 adultos, diferindo significativamente dos demais tratamentos, exceto do grau 11, que apresentou em média 143,7 adultos emergidos (Tabela 1). Baseando-se nesses resultados foi elaborado um protocolo para a multiplicação de *O. surinamensis*, conforme a metodologia utilizada, a fim de se obter um número significativo de insetos tanto para este estudo como para qualquer outro (Anexo).

Já em grãos inteiros, o número médio de adultos emergidos foi de 7,75 (Tabela 1), corroborando com os estudos de Turney (1957) que indicam que esta praga não pode viver em grãos inteiros armazenados, mesmo sob condições ótimas, e que uma quantidade maior de grãos quebrados fornecido como alimento aumenta o tamanho da

população. Ainda com relação à utilização de grãos quebrados, estudos de LeCato & McCRAY (1973) indicam que esses grãos provavelmente permitem à espécie uma melhor mobilidade e podem servir como um estímulo à oviposição.

Observou-se um número inferior de ovos nos meios testados com grãos de trigo triturados ao grau 5, 9 e 11, quando comparados ao número de adultos emergidos, pois os grãos apresentaram-se em forma de farinha, o que dificultou a visualização dos mesmos (Tabela 1). Entretanto, um número superior de larvas foi observado nos diferentes meios testados quando comparados ao número de adultos emergidos (Tabela 1). Este resultado possivelmente justifica-se pelos danos causados através do manuseio das larvas durante as avaliações, além da mortalidade natural.

Tabela 1 Número médio de ovos, larvas, pupas e adultos de *Oryzaephilus surinamensis* produzidos em grãos de trigo com diferentes graus de trituração, a $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e UR de $65 \pm 5\%$. Passo Fundo, RS, 2003.

Dietas	Nº Ovos	Nº Larvas	Nº Pupas	Nº Adultos
Trigo triturado - Grau 5	44,5 bc	172,25 b	76,00 c	126,25 b
Trigo triturado - Grau 9	61,4 b	267,75 b	103,75 b	128,75 b
Trigo triturado - Grau 11	29,9 bc	248,50 b	129,00 b	143,75 ab
Trigo triturado - Grau 20	352,1 a	571,75 a	215,00 a	199,50 a
Trigo - Grãos Inteiros	17,2 c	13,75 c	8,00 d	7,75 c

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não são significativamente diferentes, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Fleming (1988), trabalhando com um tipo diferente de aparelho triturador de grãos e testando diferentes graus de trituração (2, 4, 6, 8 e 10), encontrou que grãos de trigo triturados ao grau 8 apresentaram um maior número de insetos sobreviventes, uma boa média do período de desenvolvimento, assim como um maior número de progênie.

Da mesma forma, com o aparelho de trituração Buhler-Miag utilizado neste trabalho, os grãos de trigo triturados ao grau 20 apresentaram um resultado satisfatório concernente ao desenvolvimento e multiplicação desta espécie.

Os estudos de Armstrong & Howe (1963) indicaram que adultos de *O. surinamensis* criados sobre trigo e mantidos a 22,5°C produziram alguma progênie, mas eventualmente morreram após terem consumido todo o endosperma dos grãos quebrados disponíveis. Segundo os autores, grãos usados em experimentos de laboratório são geralmente livres de pó e de pequenos pedaços quebrados de grãos, ao contrário do que ocorre em grãos armazenados comercialmente que contém resíduos que se constituem em um alimento prontamente disponível para *O. surinamensis*.

Em contraste, Mignon *et al.* (1996) encontraram dez vezes mais progênie produzida por 2000 indivíduos de *O. surinamensis* em 300 kg de trigo inteiro, após 15 semanas, do que em quantidades idênticas de trigo com vários gradientes (3 a 15%) de grãos quebrados. Entretanto, em jarras de 1 L com densidade inicial de 250 adultos por 0,5 kg de grãos inteiros, populações de *O. surinamensis* foram incapazes de se desenvolver, confirmando que, ao menos em condições de laboratório, adultos de *O. surinamensis* devem ser criados sobre grãos quebrados.

1.3.2 Ciclo Biológico

Como *O. surinamensis* desenvolveu-se significativamente melhor em grãos de trigo triturados ao grau 20, e os demais tipos de dieta utilizados no experimento revelaram pouca ou nenhuma eficiência para a multiplicação da espécie, este meio foi adotado para avaliar o desenvolvimento ovo-adulto dos insetos.

Com relação ao número de ovos, 89% foram obtidos aos cinco dias de avaliação; 7,5% aos 10; 3,45% aos 15 e 0,05% aos 20 dias (Tabela 2, Figura 1).

Segundo Howe (1956) e Aitken (1966), o período de pré-oviposição de *O. surinamensis* geralmente é de cinco dias, a fêmea pode ovipositar até 10 ovos por dia, e atingir até 265 dias de período de oviposição.

Tabela 2 Número médio (\pm desvio padrão) de ovos de *Oryzaephilus surinamensis* produzidos em grãos de trigo com diferentes graus de trituração, a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e UR de $65 \pm 5\%$. Passo Fundo, RS, 2003.

Dieta	Dias de avaliação após a infestação							
	5	10	15	20	25	30	35	46
Trigo triturado Grau 5	0	41,0 ($\pm 22,19$)	3,5 ($\pm 1,9$)	0	0	0	0	0
Trigo triturado Grau 9	0	56,7 ($\pm 6,18$)	4,5 ($\pm 2,3$)	0,2 ($\pm 0,50$)	0	0	0	0
Trigo triturado Grau 11	0	25,2 ($\pm 6,65$)	4,5 ($\pm 3,10$)	0,2 ($\pm 0,50$)	0	0	0	0
Trigo triturado Grau 20	313,2 ($\pm 51,38$)	26,5 ($\pm 8,26$)	12,2 ($\pm 9,32$)	0,2 ($\pm 0,50$)	0	0	0	0
Trigo Grãos Inteiros	16,7 ($\pm 7,13$)	0,5 ($\pm 0,57$)	0	0	0	0	0	0

Aos cinco dias de avaliação, foram produzidas em média 2,5 larvas (0,1%), porém, entre o décimo e vigésimo quinto dias foram produzidas, aproximadamente, 99% das larvas (Tabela 3, Figura 1).

Tabela 3 Número médio (\pm desvio padrão) de larvas de *Oryzaephilus surinamensis* produzidos em grãos de trigo com diferentes graus de trituração, a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e UR de $65 \pm 5\%$. Passo Fundo, RS, 2003.

Dieta	Dias de avaliação após a infestação							
	5	10	15	20	25	30	35	46
Trigo triturado Grau 5	0	34,7 ($\pm 25,47$)	135,2 ($\pm 22,12$)	172,2 ($\pm 41,01$)	124,2 ($\pm 14,08$)	5,0 ($\pm 4,32$)	1,2 ($\pm 1,25$)	0
Trigo triturado Grau 9	0	171,5 ($\pm 32,90$)	267,5 ($\pm 84,01$)	218,7 ($\pm 27,43$)	163,2 ($\pm 27,88$)	3,5 ($\pm 1,73$)	1,2 ($\pm 0,50$)	0
Trigo triturado Grau 11	0	248,0 ($\pm 42,13$)	233,7 ($\pm 38,72$)	219,5 ($\pm 33,45$)	145,7 ($\pm 26,80$)	2,0 ($\pm 0,81$)	0,5 ($\pm 1,00$)	0
Trigo triturado Grau 20	2,5 ($\pm 2,08$)	571,7 ($\pm 76,93$)	533,2 ($\pm 85,54$)	462,5 ($\pm 110,86$)	271,2 ($\pm 60,21$)	23,5 ($\pm 19,50$)	7,7 ($\pm 4,92$)	0
Trigo Grãos Inteiros	3,0 ($\pm 2,44$)	11,7 ($\pm 2,98$)	10,5 ($\pm 3,10$)	9,5 ($\pm 2,08$)	8,5 ($\pm 1,29$)	13,1 ($\pm 6,99$)	0,7 ($\pm 0,95$)	0

Embora neste trabalho o número de ínstaes larvais não tenha sido investigado, estudos de Howe (1956) e Beckett & Evans (1994) indicaram que as larvas de *O. surinamensis* geralmente completam três ínstaes, e que o desenvolvimento sob condições de estresse é demonstrado pela ocorrência de até cinco ínstaes.

As primeiras pupas foram obtidas a partir do vigésimo dia de avaliação (1%), 91,7 ao vigésimo quinto dia (18%), 215 ao trigésimo dia (43%) e 191,5 pupas ao trigésimo quinto dia (38%) significando que a maioria das pupas são obtidas ao trigésimo dia após a infestação (Tabela 4, Figura1).

Tabela 4 Número médio (\pm desvio padrão) de pupas de *Oryzaephilus surinamensis* produzidos em grãos de trigo com diferentes graus de trituração, a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e UR de $65 \pm 5\%$. Passo Fundo, RS, 2003.

Dieta	Dias de avaliação após a infestação							
	5	10	15	20	25	30	35	46
Trigo triturado Grau 5	0	0	0	0	6,0 ($\pm 3,36$)	60,2 ($\pm 7,93$)	75,7 ($\pm 18,00$)	0
Trigo triturado Grau 9	0	0	0	0,2 ($\pm 0,50$)	14,0 ($\pm 8,79$)	100,0 ($\pm 8,90$)	102,5 ($\pm 6,65$)	0
Trigo triturado Grau 11	0	0	0	0,5 ($\pm 0,57$)	20,5 ($\pm 1,7$)	128,0 ($\pm 15,47$)	118,7 ($\pm 23,30$)	0
Trigo triturado Grau 20	0	0	0	4,2 ($\pm 2,50$)	91,7 ($\pm 18,51$)	215,0 ($\pm 18,63$)	191,5 ($\pm 42,14$)	0
Trigo Grãos Inteiros	0	0	0	0	1,2 ($\pm 0,95$)	6,0 ($\pm 1,41$)	8,0 ($\pm 1,63$)	0

Os adultos começaram a emergir ao trigésimo dia, com 21,2 (10,6%) insetos, aumentado a partir daí até 126,2 adultos ao quadragésimo sexto dia (63,3 %) (Tabela 5, Figura 1).

Assim, no grão triturado ao grau 20, é possível obter 89% de ovos ao quinto dia, 30,5% de larvas ao décimo dia, 43% de pupas ao trigésimo dia e 63,3% de adultos ao quadragésimo sexto dia (Figura 1).

Tabela 5 Número médio (\pm desvio padrão) de adultos de *Oryzaephilus surinamensis* produzidos em grãos de trigo com diferentes graus de trituração, a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e UR de $65 \pm 5\%$. Passo Fundo, RS, 2003.

Dieta	Dias de avaliação após a infestação								
	5	10	15	20	25	30	35	46	50
Trigo triturado Grau 5	0	0	0	0	0	2,2 ($\pm 2,06$)	18,7 ($\pm 8,01$)	105,2 ($\pm 24,79$)	0
Trigo triturado Grau 9	0	0	0	0	0	4,0 ($\pm 2,70$)	28,7 ($\pm 6,39$)	96,0 ($\pm 19,61$)	0
Trigo triturado Grau 11	0	0	0	0	0	4,2 ($\pm 1,70$)	35,5 ($\pm 6,45$)	104,0 ($\pm 27,89$)	0
Trigo triturado Grau 20	0	0	0	0	0	21,2 ($\pm 6,39$)	52,0 ($\pm 23,16$)	126,2 ($\pm 36,06$)	0
Trigo Grãos Inteiros	0	0	0	0	0	0,7 ($\pm 0,95$)	0,2 ($\pm 0,50$)	6,7 ($\pm 1,50$)	0

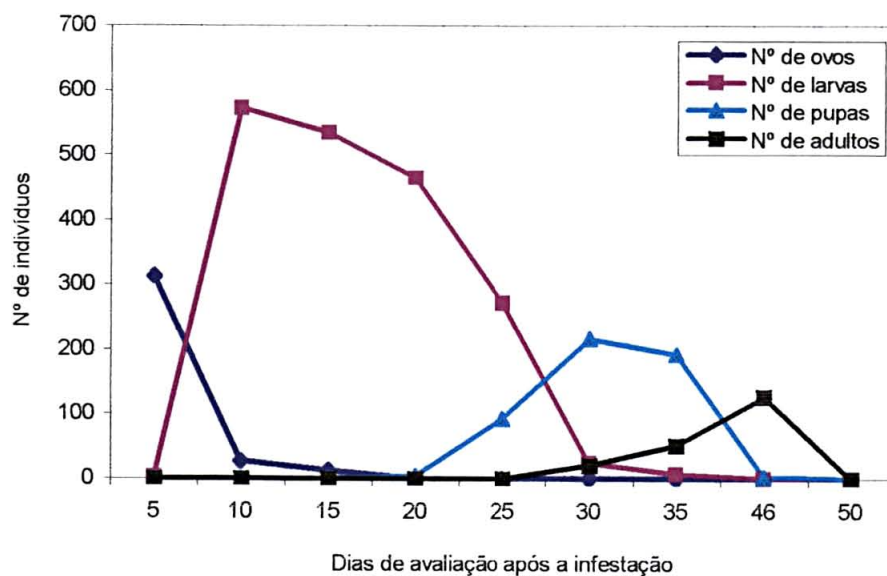


Figura 1 Número médio de ovos, pupas, larvas e adultos de *Oryzaephilus surinamensis* produzidos em grãos de trigo com diferentes graus de trituração, a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e UR de $65 \pm 5\%$. Passo Fundo, RS, 2003.

Jacob & Fleming (1989), estudando a diferença no período de desenvolvimento de algumas populações de *O. surinamensis* sobre grãos de trigo triturados, encontraram que a 25°C os ovos da população Cropwell Butler eclodiram em aproximadamente 6,6 dias, a média do período larval ficou em 21,5 dias e a do período pupal em 9 dias, perfazendo um total de 37 dias.

Segundo estudos de Beckett & Evans (1994), o período de desenvolvimento dos imaturos de *O. surinamensis* sobre grãos de trigo triturados, nas mesmas condições de temperatura e umidade relativa do ar deste trabalho, foi de 34,2 dias. Aitken (1966) observou uma taxa de desenvolvimento similar em insetos criados a 25°C e 70 % de umidade relativa do ar, com ciclo biológico de 30-38 dias.

Considerando os resultados encontrados neste trabalho e os mencionados na literatura, é importante salientar que populações coletadas em unidades armazenadoras, na maioria das vezes, apresentam período de desenvolvimento diferente quando comparadas a populações criadas em laboratório, assim como também há diferença entre períodos de estágios imaturos de populações coletadas em diferentes regiões geográficas e também coletadas em diferentes tipos de alimentos.

1.3.3 Longevidade

Os adultos de *O. surinamensis* sobreviveram, a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de $65 \pm 5\%$, até 450 dias em grãos de trigo triturados a diferentes graus, com exceção de grãos inteiros, onde os insetos só sobreviveram até 60 dias (Tabela 6, Figura 2). Este resultado, novamente, confirma que grãos inteiros não favorecem à multiplicação, e tampouco a sobrevivência dessa espécie.

O maior número de adultos mortos foi observado no terceiro trimestre de avaliação, cerca de 270 dias após a infestação, nos diferentes meios testados, com

mortalidade média entre 30 e 37% nos diferentes meios (Tabela 6, Figura 2). Como não houve diferença estatística entre os tratamentos no terceiro e quinto trimestres de avaliações (Tabela 6), pode-se inferir que os diferentes meios de criação não interferiram na longevidade de *O. surinamensis*; e que as diferenças estatísticas observadas entre os tratamentos no primeiro, segundo e quarto trimestres devem-se ao fato de que o número inicial de insetos adultos colocados em cada dieta foi diferente (Tabela 6).

Os resultados encontrados neste trabalho, representam uma importante contribuição metodológica para estudos que envolvam a criação massal de *O. surinamensis* e, se associados ao manejo integrado dessa praga, poderão possivelmente contribuir significativamente para o seu controle.

Tabela 6 Número médio de adultos mortos (\pm desvio padrão) de *Oryzaephilus surinamensis* em grãos de trigo triturados a diferentes graus, em cinco trimestres de avaliação. Passo Fundo, RS, 2003.

Dietas	Nº Adultos*	1 – 90 dias	91 – 180 dias	181 – 270 dias	271 – 360 dias	361 – 450 dias
Grau 5	126,25	13,5 (\pm 9,25) ab	19,00 (\pm 4,69) b	44,00 (\pm 18,38) a	35,50 (\pm 6,75) ab	7,50 (\pm 3,31) a
Grau 9	128,75	11,25 (\pm 5,31) ab	29,00 (\pm 6,48) ab	48,25 (\pm 19,87) a	25,25 (\pm 5,73) b	6,25 (\pm 2,21) a
Grau 11	143,75	20,25 (\pm 0,5) a	26,00 (\pm 4,69) b	43,50 (\pm 16,98) a	41,00 (\pm 13,95) ab	5,50 (\pm 1,00) a
Grau 20	199,50	22,00 (\pm 7,43) a	54,50 (\pm 14,36) a	68,50 (\pm 26,33) a	47,25 (\pm 7,76) a	3,50 (\pm 1,00) a
Inteiros	7,75	4,00 (1,63) b	3,75 (\pm 1,25) c	0	0	0

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não são significativamente diferentes, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

* Média do número de adultos avaliados.

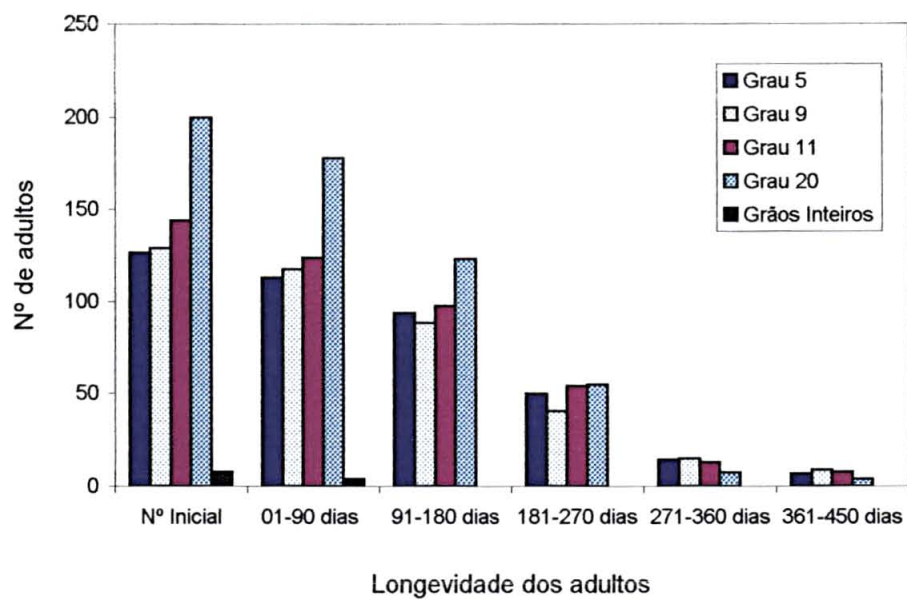


Figura 2 Número médio de adultos sobreviventes de *Oryzaephilus surinamensis* em grãos de trigo triturados a diferentes graus, em cinco trimestres de avaliação, a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e UR de $65 \pm 5\%$. Passo Fundo, RS, 2003.

1.4 Referências Bibliográficas

- Aitken, A.D. (1966) A strain of small *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera, Silvanidae) from the Far East. *Journal of Stored Products Research* **2**, 45-55.
- Armstrong, M.T. & Howe, R.W. (1963) The sawtoothed grain beetle (*Oryzaephilus surinamensis*) in home-grown grain. *Journal of Agricultural Engineering Research* **8**, 256-261.
- Beckett, S.J. & Evans, D.E. (1994) The demography of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae) on Kibbled wheat. *Journal of Stored Products Research* **30**, 121-137.
- Campbell, A. & Sinha, R.N. (1976) Damage of wheat by feeding of some stored product beetles. *Journal of Economic Entomology* **69**, 11-13.
- Champ, B.R. & Dyte, C.E. (1976) *Informe de la prospeccion mundial de la FAO sobre susceptibilidad a los insecticidas de las plagas de granos almacenados*. 356 pp. Roma.
- Collins, P.J., Mulder, J.C. & Wilson, D. (1989) Variation in life history parameters of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae). *Journal of Stored Products Research* **25**, 193-199.

- Fleming, D.A. (1988) The influence of wheat kernel damage upon the development and productivity of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae). *Journal of Stored Products Research* **24**, 233-236.
- Fraenkel, G. & Blewett, M. (1943) The natural foods and the food requirements of several species of stored products insects. *Transactions of the Royal Entomological Society of London* **93**, 457-490.
- Howe, R.W. (1956) The biology of the two common storage species of *Oryzaephilus* (Coleoptera, Cucujidae). *Annals of Applied Biology* **44**, 341-355.
- Howe, R.W. (1965) A summary of estimates of optimal and minimal conditions for population increase of some stored products insects. *Journal of Stored Products Research* **1**, 177-184.
- Howe, R.W. (1973) Loss of viability of seed in storage attributable to infestations of insects and mites. *Seed Science & Technology* **1**, 563-586.
- Jacob, T.A. & Fleming, D.A. (1989) The difference in the development period and mortality of some field strains of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) at constant temperatures (Coleoptera: Silvanidae). *Journal of Stored Products Research* **25**, 73-76.
- Kim, Y.S. & Smith, B.H. (2000) Effect of an amino acid on feeding preferences and learning behavior in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology* **46**, 793-801.

- LeCato, G.L. & McCRAY, T.L. (1973) Multiplication of *Oryzaephilus* spp. and *Tribolium* spp. on 20 natural product diets. *Environmental Entomology* **2**, 176-179.
- Lorini, I. (2001) *Manual Técnico para o Manejo Integrado de Pragas de Grãos de Cereais Armazenados*. 80 pp. Embrapa Trigo. Passo Fundo, RS.
- Mason, P.L. (1996) Population biology of the sawtoothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae), in an experimental model of a fabric treatment. *Bulletin of Entomological Research* **86**, 377-385.
- Mignon, J., Haubruge, E., Liénard, V., Gaspar, Ch. & Lognay, G. (1996) Mortality in *Oryzaephilus surinamensis* following short-term exposure to conditioned kernels by high-density culture. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **80**, 555-557.
- Nakajima, S., Sugawara, K., Takeda, T., Tateishi, M., Okamura, A., Iwasa, J. & Baba, N. (1996) Arrestants to *Oryzaephilus surinamensis* L. from wheat flour infested by the same weevil. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 1546-1547.
- Sinha, R.N. (1971) Multiplication of some stored-product insects on varieties of wheat, oats, and barley. *Journal of Economic Entomology* **64**, 98-102.
- Thomas, E.L. & Shepard, H.H. (1940) The influence of temperature, moisture, and food upon the development and survival of the saw-toothed grain beetle. *Journal of Agricultural Research* **60**, 605-615.

- Tuff, D.W. & Telford, H.S. (1964) Wheat fracturing as affecting infestation by *Cryptolestes ferrugineus*. *Journal of Economic Entomology* **57**, 513-516.
- Turney, H.A. (1957) Some effects of cracked grain on the reproduction of the saw-toothed grain beetle. *Journal of Kansas Entomological Society* **30**, 6-8.
- Verner, P.H. (1971) Food preferences of two species of *Oryzaephilus* (Coleoptera, Cucujidae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca* **68**, 145-148.

CAPÍTULO 2

DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA DE *Oryzaephilus surinamensis* (L.)

(COLEOPTERA: SILVANIDAE) A INSETICIDAS

ORGANOFOSFORADOS E PIRETRÓIDES

Resumo – A fim de verificar se a baixa eficácia dos inseticidas protetores de grãos no controle de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) é devida à resistência, foram realizados bioensaios com doze populações desta espécie, provenientes de diversas localidades do Sul do Brasil. Usou-se o método da FAO de exposição dos adultos ao papel filtro impregnado com os inseticidas organofosforados fenitrotiom e pirimifós-metil e com os piretróides deltametrina e bifentrina. Os resultados mostraram que as populações OS12 e OS10 apresentaram níveis de resistência de 11,6 e 12,7 vezes, respectivamente, ao inseticida fenitrotiom e, as populações OS3 e OS10, 21,1 e 23,5 vezes, respectivamente, ao inseticida deltametrina, quando comparadas à população suscetível. O estudo comprovou que as populações com histórico de uso contínuo de inseticidas apresentaram níveis mais elevados de resistência aos inseticidas testados, requerendo um manejo adequado para o seu controle.

Palavras-chave: *Oryzaephilus surinamensis*, Coleoptera, resistência, organofosforados, piretróides

Abstract – To verify if resistance is responsible by low efficiency of the protectant insecticides used to control *Oryzaephilus surinamensis* (L.), bioassays were carried out with twelve strains of this species, originated from different localities of southern Brazil. The standard technique recommended by F.A.O. using the insecticide impregnated filter paper method was used with the organophosphorus insecticides fenitrothion and pirimiphos-methyl, and pyrethroids deltamethrin and bifenthrin. The strains OS12 and OS10 showed resistance level of, 11,6 and 12,7 times to the organophosphorus insecticide fenitrothion, respectively. The OS3 and OS10 strains were 21,1 and 23,5 times more resistant to the pyrethroid deltamethrin than the susceptible strain, respectively. The study proved that strains with historical of continuous use of insecticides showed higher level of resistance to insecticides tested, requiring an appropriate management for its control.

Keywords: *Oryzaephilus surinamensis*, Coleoptera, resistance, organophosphorus, pyrethroid

2.1 Introdução

A espécie *Oryzaephilus surinamensis* (L.) é uma praga de grãos armazenados que pode danificar significativamente uma massa de grãos quando em grande densidade populacional, o que conduz ao amplo uso de inseticidas pelos armazenadores.

O sucesso de um tratamento com inseticida residual depende, entre outros fatores, do status de resistência da população (Barson *et al.*, 1992). Segundo Collins (1985), uma das maiores desvantagens dos protetores químicos de grãos é a pressão seletiva sobre as populações de insetos, favorecendo o desenvolvimento da resistência.

A resistência de pragas a inseticidas é um exemplo de evolução das espécies, demonstrando como podem sobreviver e mudar fisiologicamente sob pressão dos químicos que as selecionam geneticamente (Lorini & Beckel, 2002). Como exemplo, a resistência da praga de grãos armazenados *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) ao inseticida piretróide deltametrina (Lorini & Galley 1999; 2001) e a resistência cruzada da mesma praga aos inseticidas pirimifós-metil, clorpirifós-metil e permetrina (Lorini & Galley, 2001) resultaram da associação dos mecanismos de resistência metabólicos e redução da sensibilidade do sistema nervoso.

De acordo com Watson & Barson (1996), a incidência e o grau de resistência de *O. surinamensis* a inseticidas têm aumentado desde a detecção de resistência ao inseticida lindane, no início da década de 1970. Populações da praga, em vários países, têm desenvolvido resistência aos inseticidas malatíon, fenitrotíon, clorpirifós-metil e pirimifós-metil (Brun & Attia, 1983; Herron, 1990; Collins *et al.*, 1993).

Como *O. surinamensis* apresenta uma capacidade fraca de vôo (Champ & Dyte, 1976), infestações em armazéns são o resultado do recebimento de lotes de grãos já infestados ou de populações residuais desse inseto nas instalações dos armazéns. Segundo Collins (1985), populações residentes nos silos e armazéns estão sujeitas à

pressão constante de inseticidas, contribuindo para a infestação de novos lotes de grãos e para o aumento da resistência aos ingredientes ativos utilizados.

Segundo Taylor & Georghiou (1982), modelos de simulação indicam que condições como o amplo uso de inseticidas persistentes contra populações de insetos, com pouca ou nenhuma imigração de indivíduos suscetíveis, são ideais para o desenvolvimento da resistência.

Essa situação vem sendo observada em armazéns da região sul do Brasil, onde *O. surinamensis* tem ocorrido praticamente em todas as unidades armazenadoras e causado sérios prejuízos ao armazenamento de grãos. A espécie não tem respondido significativamente aos tratamentos químicos, e é uma das primeiras a colonizar a massa de grãos após a aplicação de inseticidas (Lorini, 2001).

Outro fator agravante é a disponibilidade de apenas quatro inseticidas registrados para o controle de pragas em grãos armazenados: dois organofosforados (fenitrotiom e pirimifós-metil) e dois piretróides (deltametrina e bifentrina) (Lorini, 2001).

Os inseticidas organofosforados, desenvolvidos na década de 1960, foram os primeiros a substituírem os representantes do grupo dos organoclorados, aos quais os insetos já apresentavam resistência. Os organofosforados atuam por contato e ingestão, agindo como inibidores das enzimas colinesterases, causando o aumento dos impulsos nervosos, o que ocasiona a morte do inseto (Superintendência de Controle de Endemias, 2003).

Os inseticidas piretróides foram introduzidos no mercado em 1976 e apresentam maior capacidade letal para os insetos, maior estabilidade à luz e calor e menor volatilidade, quando comparados aos organofosforados. Ainda que sejam mais caros por unidade de peso em relação aos outros inseticidas, os piretróides têm sido bastante

empregados na área agrícola. Isto ocorre devido à alta eficiência, sendo necessárias menores quantidades de produto ativo, resultando em menor contaminação nas aplicações. São os compostos de mais rápida ação na interferência da transmissão de impulsos nervosos (Superintendência de Controle de Endemias, 2003).

Apesar do quadro de baixa eficácia dos inseticidas no controle de *O. surinamensis*, no Brasil, ainda não há estudos para avaliar se é caso de resistência ou de falhas na aplicação dos protetores. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a resistência de populações de *O. surinamensis* coletadas em unidades armazenadoras da região sul, aos inseticidas organofosforados e piretróides registrados para uso no controle da praga.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Populações de *O. surinamensis*

Foram testadas doze populações de *O. surinamensis* coletadas em unidades armazenadoras de grãos, identificadas segundo sua origem e data de coleta (Tabela 1).

Para cada população de *O. surinamensis* utilizada no experimento foi levantado o histórico de exposição aos inseticidas piretróides e organofosforados. Os indivíduos da população OS1 foram coletados em uma unidade armazenadora onde os grãos receberam apenas tratamento com expurgo. As populações OS3, OS7 e OS12 foram submetidas à aplicação de inseticidas piretróides por 10, 3 e 5 anos, respectivamente. As demais populações receberam aplicação de misturas de inseticidas piretróides e organofosforados ao longo dos anos nas unidades armazenadoras de origem, como segue: a população OS2 recebeu aplicação esporádica de misturas, a OS13 foi submetida à pressão de seleção por misturas por 3 anos, as populações OS4 e OS9 por 5 anos, OS6 por 8 anos e as populações OS5, OS10 e OS11 por 10 anos antes da coleta.

Todas as populações, desde a época da coleta, foram mantidas no Laboratório de Entomologia da Embrapa Trigo, em Passo Fundo, RS, e em virtude disso, receberam a designação de geração F_{n+1} , indicando a primeira geração obtida em laboratório.

Os espécimes utilizados nos bioensaios foram mantidos em laboratório em grãos de trigo triturados ao grau 20, conforme descrito no Capítulo 1, item 1.2.2.

Os grãos não receberam aplicação de inseticida durante sua produção a campo e foram mantidos em freezer a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, esterilizados em estufa por uma hora a 60°C e mantidos em sala climatizada, à temperatura de $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar de $65 \pm 5\%$ por aproximadamente três horas, antes de serem fornecidos como alimento para os insetos.

2.2.2 Bioensaios para avaliação da resistência

Foram utilizados quatro inseticidas registrados no Brasil para o controle de pragas de grãos armazenados, como segue: organofosforados, fenitrotiom 500g i.a./L (Sumigran 500 CE) e pirimifós-metil 500g i.a./L (Actellic 500 CE); e piretróides, deltametrina 25g i.a./L (Decis 25 CE) e bifentrina 25g i.a./L (Brigade 25 CE).

Para o desenvolvimento dos bioensaios foram adotados os métodos recomendados pela FAO – Método nº 15 (Anônimo, 1974). Essa metodologia foi testada e comparada com outros métodos de avaliação de resistência em *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae), por Lorini & Galley (1998), e demonstrou eficácia na detecção dos níveis de resistência.

No entanto, algumas modificações foram requeridas para *O. surinamensis*, como por exemplo, a utilização de massa de calafetar para vedar as placas de Petri, a fim de evitar a fuga dos insetos.

As doze populações foram testadas com os inseticidas fenitrotiom e deltametrina, enquanto que apenas as populações OS1, OS2, OS3, OS4 e OS5 foram testadas com os inseticidas pirimifós-metil e bifentrina.

Cada população foi submetida a cinco tratamentos, em quatro repetições, com cada inseticida e um controle, tratado apenas com solvente. Cada inseticida foi diluído em éter de petróleo para as concentrações requeridas, e 1,0 mL da concentração foi aplicado sobre o papel filtro de 9 cm de diâmetro. Estes foram mantidos em sala ventilada durante aproximadamente uma hora, para evaporação do solvente, antes de serem colocados nas placas de Petri. Posteriormente, 10 insetos adultos de *O. surinamensis* de 1-20 dias de idade, não sexados, foram liberados em cada repetição. O experimento foi mantido em sala climatizada, à temperatura de $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar de $65 \pm 5\%$.

2.2.3 Avaliação dos dados e análise estatística

A avaliação da mortalidade que visou estabelecer as concentrações letais (CL_{50}) de cada população foi feita pela contagem do número de insetos mortos 24 horas após o tratamento, considerando-se mortos os insetos que não puderam caminhar normalmente durante um período de observação de 2 minutos.

Para a determinação da CL_{50} para cada população, os resultados de mortalidade dos bioensaios foram analisados pelo programa estatístico GLIM, Royal Statistical Society, versão 3.77 (Crawley, 1993).

Tabela 1 Procedência e ano de coleta das populações de *Oryzaephilus surinamensis* utilizadas nos bioensaios para a verificação da resistência aos inseticidas organofosforados e piretróides, em laboratório.

População	Procedência	Ano de coleta
OS1	Passo Fundo – RS	1998
OS2	Ubiratã – PR	1998
OS3	Santo Ângelo – RS	1998
OS4	Saldanha Marinho – RS	1998
OS5	Assai – PR	2000
OS6	Kaloré – PR	2000
OS7	Marau – RS	2001
OS9	Ubiratã – PR	2001
OS10	Assis Chateaubriand – PR	2001
OS11	Mandaguari – PR	2002
OS12	Maringá – PR	2002
OS13	Videira – SC	2002

2.3 Resultados e Discussão

Os resultados dos bioensaios em papel filtro tratado com os inseticidas organofosforados e piretróides mostraram que a população OS1, como o histórico já indicava, foi a mais suscetível (Tabelas 2, 4 e 5). Já para os resultados dos bioensaios com o piretróide deltametrina, a população OS13 foi considerada suscetível (Tabela 3).

Os bioensaios com fenitrotiom mostraram que as populações OS2 e OS3 não apresentaram diferenças significativas com a CL_{50} da população OS1, sendo portanto consideradas suscetíveis a esse inseticida, já que o valor da CL_{50} da população OS1 representa o nível de tolerância normal dessa espécie a esse inseticida (Tabela 2 e Figuras 1A-C). Os indivíduos da população OS2 receberam aplicações esporádicas de misturas de organofosforados e piretróides, enquanto a população OS3 sofreu pressão de seleção apenas com inseticidas piretróides, justificando o resultado encontrado.

As populações OS10 e OS12 apresentaram os maiores fatores de resistência ao fenitrotiom: 12,7 e 11,6 vezes, respectivamente. As outras populações, OS5, OS9,

OS13, OS11, OS7, OS6 e OS4 exibiram fatores de resistência de até 8,5 vezes, quando comparadas à população suscetível (Tabela 2; Figuras 1D-F; Figuras 2A-F).

Os resultados encontrados para os bioensaios com o piretróide deltametrina mostraram que a população suscetível OS13 diferiu estatisticamente das demais populações (Tabela 3; Figuras 3A-F; Figuras 4A-F), e que a população OS10 apresentou um fator de resistência de 23,5 vezes quando comparada à população OS13. Este resultado justifica-se pelo fato da unidade armazenadora na qual os insetos da população OS10 foram coletados apresentar um histórico de aplicação de misturas de inseticidas organofosforados e piretróides por, no mínimo, dez anos.

Os resultados da determinação da resistência das populações de *O. surinamensis* ao inseticida organofosforado pirimifós-metil mostraram que as populações OS2, OS3, OS4 e OS5 diferiram significativamente da população suscetível OS1, entretanto não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 4 e Figuras 5A-E). Também, é possível, neste caso, inferir que a resistência esteja começando a se expressar pelo mesmo motivo de longa exposição a inseticidas já mencionado.

Resultado similar ao anterior foi observado em bioensaios com o inseticida piretróide bifentrina, onde as populações OS2, OS3, OS4 e OS5 diferiram significativamente da população suscetível OS1, mas não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 5 e Figuras 6A-E). Este resultado pode estar indicando um nível inicial de resistência à bifentrina já que, à exceção da população OS2 que recebeu aplicação esporádica de inseticidas organofosforados e piretróides, as demais populações OS3, OS4 e OS5 receberam aplicação de inseticidas piretróides e organofosforados por até dez anos antes da coleta.

Os resultados dos testes com os quatro inseticidas confirmam os estudos de Collins (1985), que indicam que infestações em armazéns são o resultado de lotes de

grãos já infestados ou de populações residuais de *O. surinamensis* em armazéns e possivelmente sendo continuamente submetidos à pressão de seleção de inseticidas.

Como o histórico indicou, os indivíduos de todas as populações foram submetidos a um grau menor ou maior a pressão de seleção por inseticidas e a resistência dessas populações era prevista, considerando as falhas de controle evidenciadas na maioria das unidades armazenadoras.

Além disso, o valor de *b* (coeficiente angular), observado na análise dos bioensaios em todas as populações, indica uma considerável heterogeneidade desses indivíduos aos inseticidas testados (Tabelas 2, 3, 4 e 5). Isto sugere um grande potencial para o desenvolvimento de níveis maiores de resistência com a continuidade de pressão de seleção (Ding *et al.*, 2002).

No entanto, Muggleton (1983), que trabalhou com populações de *O. surinamensis* resistentes a malatim, indicou que o polimorfismo para a resistência a esse inseticida é transitório, pois, na ausência do inseticida, a frequência de indivíduos resistentes na população declinou rapidamente. Ainda que dados similares não tenham sido verificados nesse trabalho para os inseticidas testados, possivelmente, as diferentes populações de *O. surinamensis* existentes em unidades armazenadoras recuperem rapidamente a suscetibilidade se a pressão de seleção por inseticidas for interrompida e com a imigração de novas populações em lotes de grãos infestados.

Concluindo, como a espécie *O. surinamensis* ainda não havia sido estudada no Brasil no que diz respeito à resistência a inseticidas, este trabalho demonstrou que a espécie apresenta níveis variados de resistência aos inseticidas testados, de acordo com a procedência e o histórico de exposição aos ingredientes ativos, evidenciando que o uso de inseticidas para controlar pragas em grãos armazenados precisa ser cuidadosamente gerenciado nos programas de manejo da resistência.

Tabela 2 Valores da CL₅₀ (µg/cm²) para adultos de populações de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) expostos a papel filtro tratado com fenitrotiom para a determinação do fator de resistência, a 25 ± 0,5°C e UR de 65 ± 5 %. Passo Fundo, RS, 2003.

Populações/ Gerações	CL ₅₀ (95% I.C.) [*]	a	EP _a	b	EP _b	FR
OS1 (Fn+5)	0,4105 (0,3205-0,5331) A	1,180	0,2469	3,052	0,4366	-
OS3 (Fn+6)	0,6787 (0,4563-1,217) AB	0,2925	0,2023	1,737	0,3775	1,6
OS2 (Fn+7)	0,7595 (0,5343-1,275) AB	0,2416	0,2034	2,022	0,3906	1,8
OS5 (Fn+3)	0,9466 (0,7066-1,439) BC	0,06506	0,2051	2,729	0,4680	2,3
OS9 (F ⁰)	1,463 (1,011-2,835) CD	-0,4148	0,2047	2,509	0,4947	3,5
OS13 (F ⁰)	1,882 (1,493-2,293) D	-1,233	0,3046	4,490	0,6492	4,5
OS11 (F ⁰)	2,546 (2,106-3,046) E	-2,101	0,3648	5,177	0,6939	6,2
OS7 (F ⁰)	2,556 (2,130-3,040) EF	-2,235	0,3802	5,484	0,7348	6,2
OS6 (F ⁰)	2,911 (2,462-3,428) EF	-2,858	0,4463	6,160	0,8187	7,1
OS4 (Fn+5)	3,4880 (2,608-4,651) FG	-1,422	0,2772	2,620	0,4126	8,5
OS12 (F ⁰)	4,780 (4,026-5,694) GH	-3,825	0,5352	5,629	0,7363	11,6
OS10 (F ⁰)	5,235 (4,393-6,273) H	-3,879	0,5386	5,396	0,7096	12,7

^{*} Os valores seguidos com as mesmas letras não são significativamente diferentes entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

a = coeficiente linear; b = coeficiente angular; EP = Erro Padrão

FR = Fator de Resistência (qualquer CL₅₀ dividida pela CL₅₀ da população OS1)

Tabela 3 Valores da CL₅₀ (µg/cm²) para adultos de populações de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) expostos a papel filtro tratado com deltametrina para a determinação do fator de resistência, a 25 ± 0,5°C e UR de 65 ± 5 %. Passo Fundo, RS, 2003.

Populações/ Gerações	CL ₅₀ (95% I.C.) [*]	a	EP _a	b	EP _b	FR
OS13 (F ⁰)	3,010 (2,127-4,084) A	-1,136	0,2746	2,374	0,4071	-
OS1 (Fn+4)	15,73 (8,439-22,92) B	-2,419	0,6283	2,021	0,4101	5,2
OS2 (Fn+6)	16,22 (10,33-22,06) B	-3,106	0,6746	2,567	0,4537	5,3
OS4 (Fn+4)	21,86 (15,46-28,75) B	-3,685	0,6816	2,751	0,4470	7,2
OS11 (F ⁰)	22,93 (16,39-30,09) BC	-3,764	0,6827	2,766	0,4453	7,6
OS9 (F ⁰)	23,95 (16,86-31,98) BC	-3,504	0,6540	2,540	0,4248	7,95
OS12 (F ⁰)	31,13 (23,69-40,07) BCD	-4,536	0,7184	3,038	0,4533	10,34
OS5 (Fn+3)	36,49 (26,08-50,40) BCDE	-3,576	0,6507	2,289	0,3989	12,1
OS6 (F ⁰)	41,82 (32,61-53,89) CDE	-5,138	0,7603	3,169	0,4606	13,8
OS7 (F ⁰)	47,61 (37,28-62,10) DE	-5,216	0,7462	3,109	0,4476	15,8
OS3 (Fn+5)	63,55 (49,81-84,45) DE	-5,752	0,8342	3,190	0,4775	21,1
OS10 (F ⁰)	70,74 (55,36-95,20) E	-5,916	0,8605	3,198	0,4860	23,5

^{*} Os valores seguidos com as mesmas letras não são significativamente diferentes entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

a = coeficiente linear; b = coeficiente angular; EP = Erro Padrão

FR = Fator de Resistência (qualquer CL₅₀ dividida pela CL₅₀ da população OS13)

Tabela 4 Valores da CL_{50} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) para adultos de populações de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) expostos a papel filtro tratado com pirimifós-metil para a determinação do fator de resistência, a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e UR de $65 \pm 5 \%$. Passo Fundo, RS, 2003.

Populações/ Gerações	CL_{50} (95% I.C.) *	a	EP_a	b	EP_b	FR
OS1 (Fn+5)	0,3543 (0,2746-0,4536) A	1,432	0,2611	3,177	0,4617	-
OS2 (Fn+7)	0,5837 (0,4534-0,7844) B	0,6927	0,2219	2,963	0,4435	1,6
OS3(Fn+6)	0,6371 (0,4718-0,9286) B	0,4735	0,2103	2,418	0,4166	1,8
OS5 (Fn+3)	0,7305 (0,5833-0,9541) B	0,4947	0,2206	3,628	0,5313	2,0
OS4 (Fn+4)	0,9416 (0,7131-1,3880) B	0,07592	0,2063	2,905	0,4845	2,6

* Os valores seguidos com as mesmas letras não são significativamente diferentes entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

a = coeficiente linear; b = coeficiente angular; EP = Erro Padrão

FR = Fator de Resistência (qualquer CL_{50} dividida pela CL_{50} da população OS1)

Tabela 5 Valores da CL_{50} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) para adultos de populações de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) expostos a papel filtro tratado com bifentrina para a determinação do fator de resistência, a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e UR de $65 \pm 5 \%$. Passo Fundo, RS, 2003.

Populações/ Gerações	CL_{50} (95% I.C.) *	a	EP_a	b	EP_b	FR
OS1 (Fn+4)	2,686 (2,024-3,446) A	-1,321	0,2889	3,078	0,4623	-
OS3 (Fn+5)	6,358 (4,807-8,944) B	-2,129	0,3394	2,651	0,4332	2,3
OS5 (Fn+3)	6,668 (5,286-8,745) B	-2,822	0,4073	3,425	0,5025	2,4
OS4 (Fn+4)	7,950 (6,569-9,988) B	-4,023	0,4140	4,468	0,5005	2,9
OS2 (Fn+6)	11,45 (7,886-21,59) B	-2,311	0,3618	2,183	0,4335	4,2

* Os valores seguidos com as mesmas letras não são significativamente diferentes entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

a = coeficiente linear; b = coeficiente angular; EP = Erro Padrão

FR = Fator de Resistência (qualquer CL_{50} dividida pela CL_{50} da população OS1)

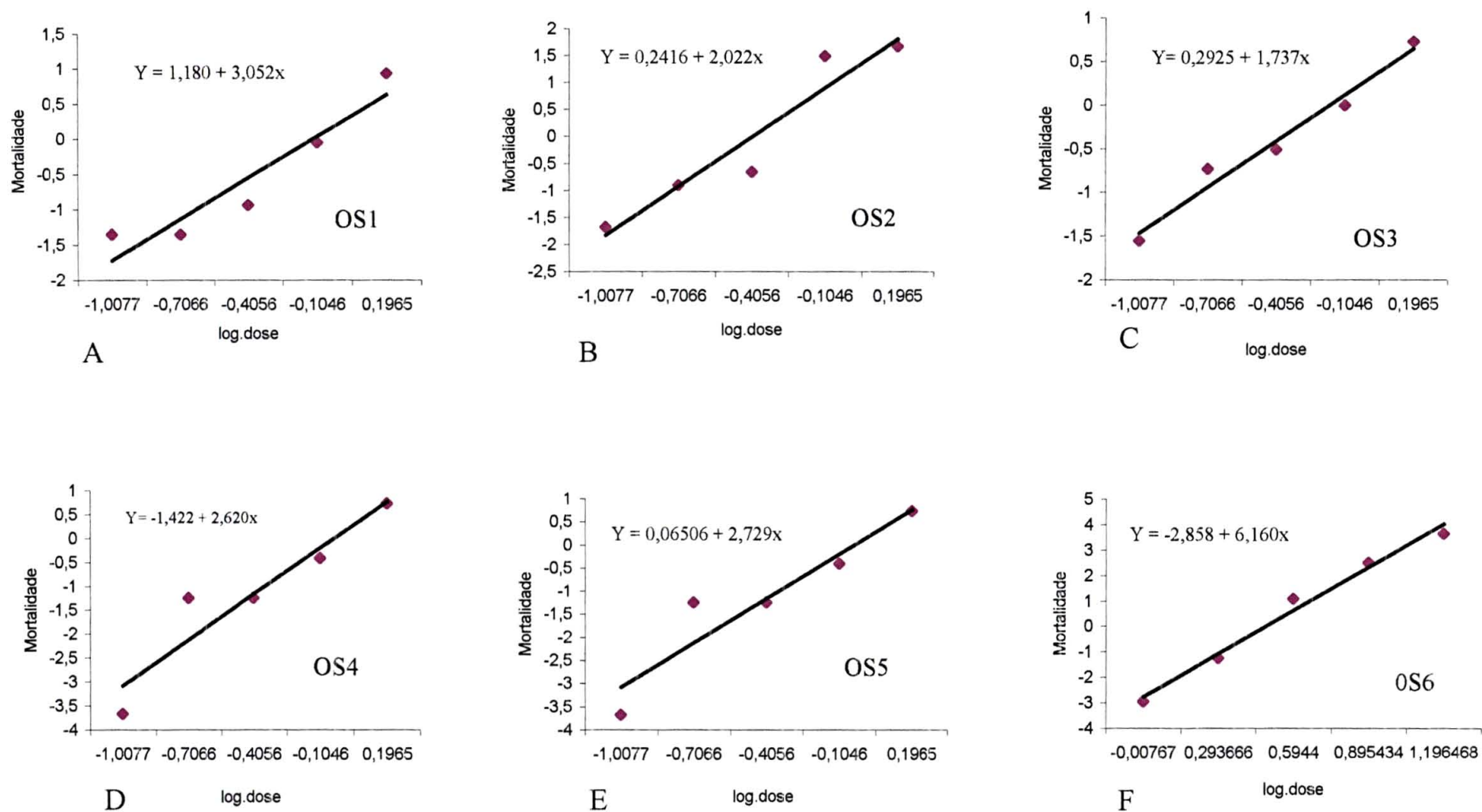


Figura 1 Mortalidade de adultos de seis populações de *Oryzaephilus surinamensis*, submetidas a diferentes concentrações de fenitrotiom ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), em papel filtro impregnado, em 5 repetições, a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e UR de $65 \pm 5\%$. Passo Fundo, RS, 2003.

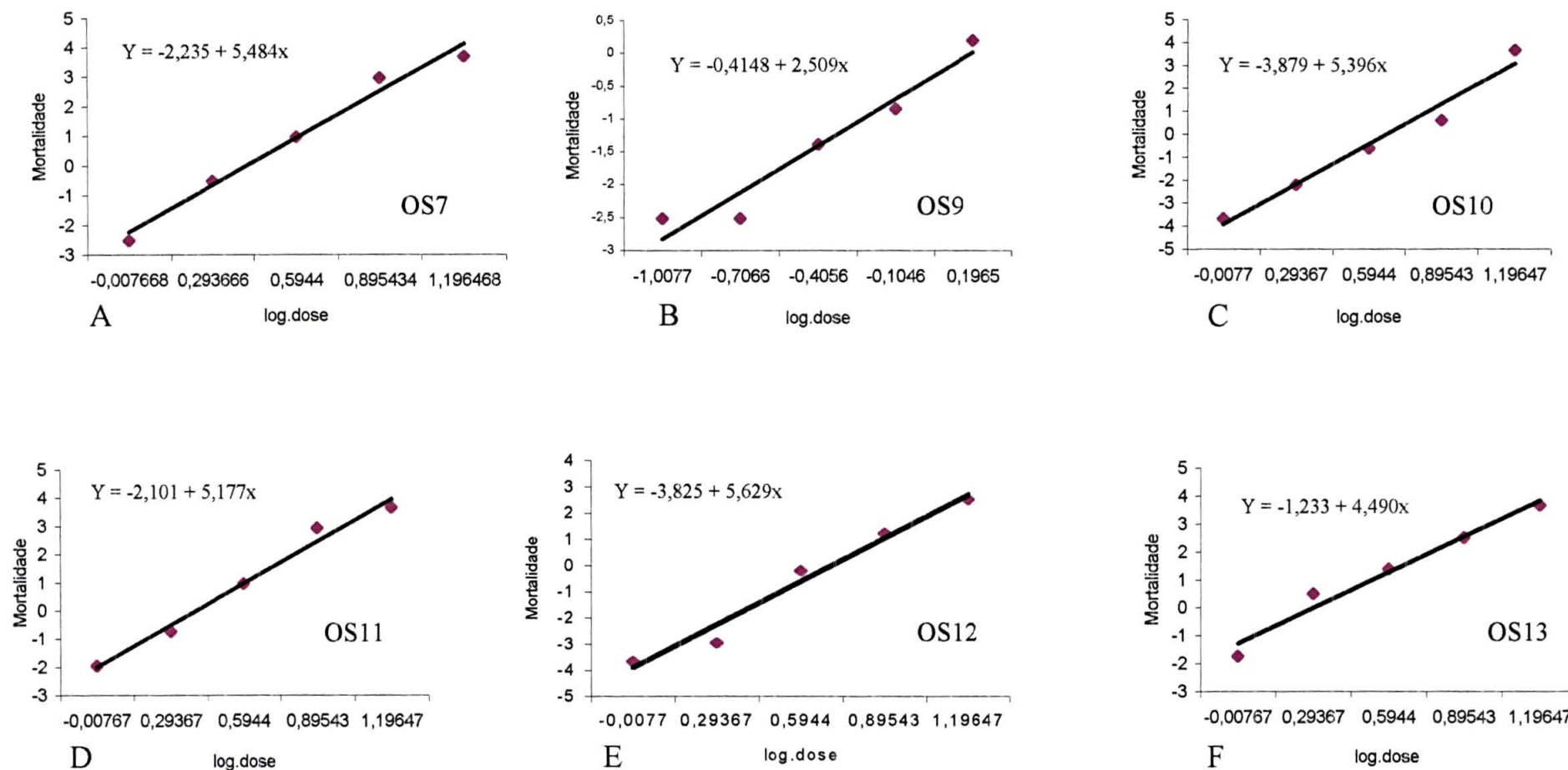


Figura 2 Mortalidade de adultos de populações de *Oryzaephilus surinamensis*, submetidas a diferentes concentrações de fenitrotiom ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), em papel filtro impregnado, em 5 repetições, a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e UR de $65 \pm 5\%$. Passo Fundo, RS, 2003.

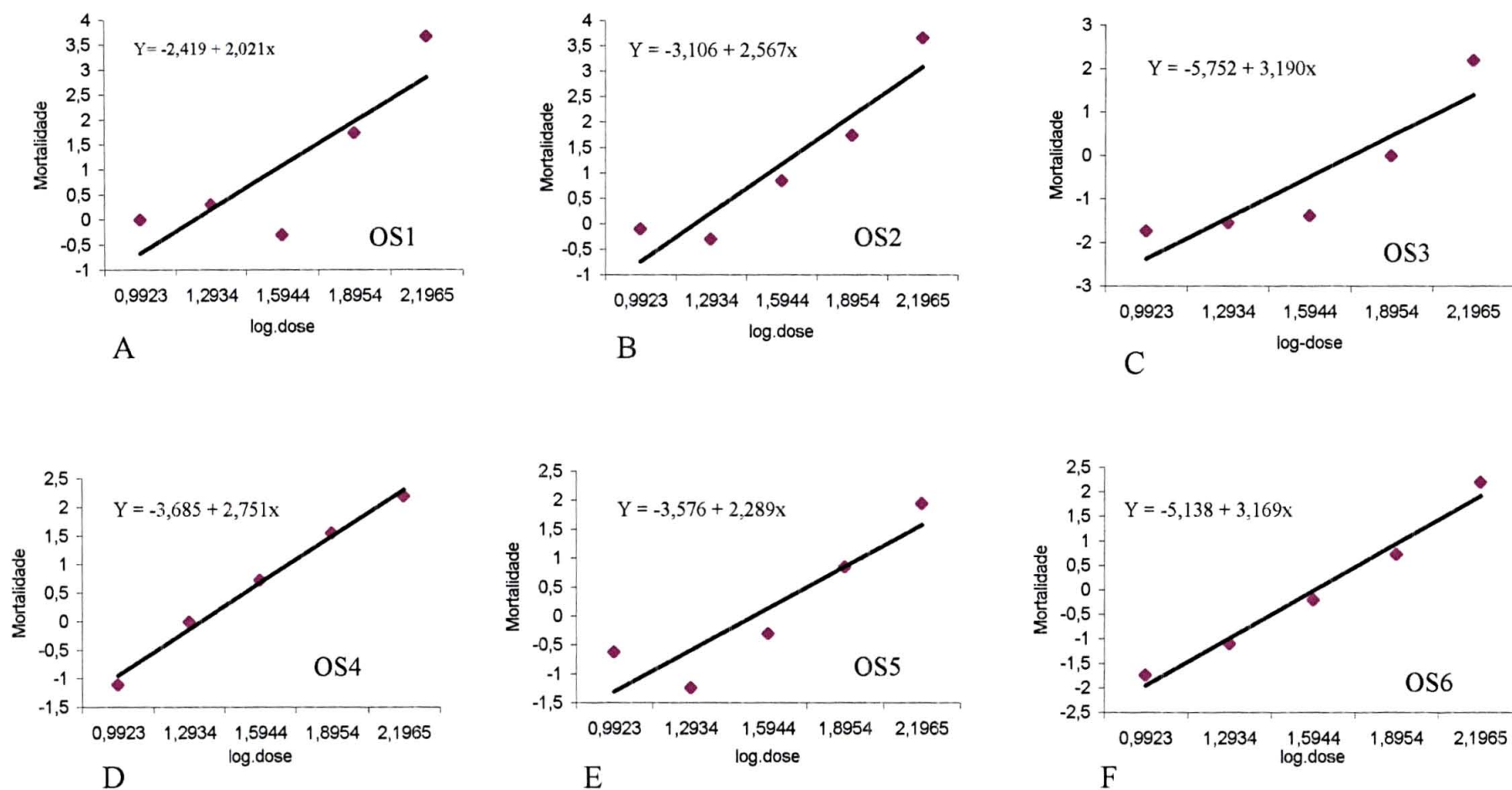
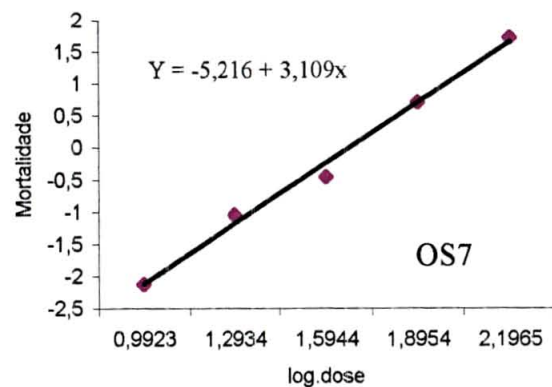
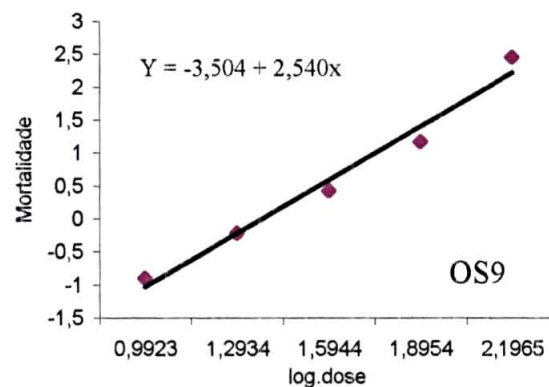


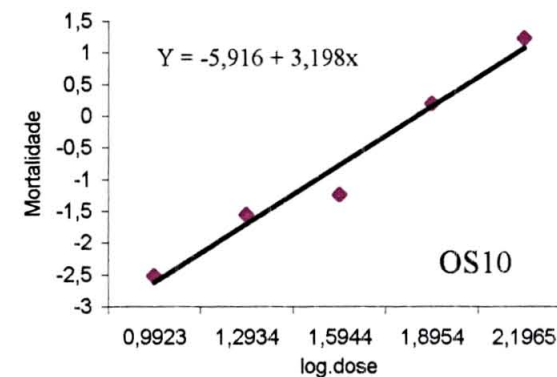
Figura 3 Mortalidade de adultos de populações de *Oryzaephilus surinamensis*, submetidas a diferentes concentrações de deltametrina ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), em papel filtro impregnado, em 5 repetições, a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e UR de $65 \pm 5\%$. Passo Fundo, RS, 2003.



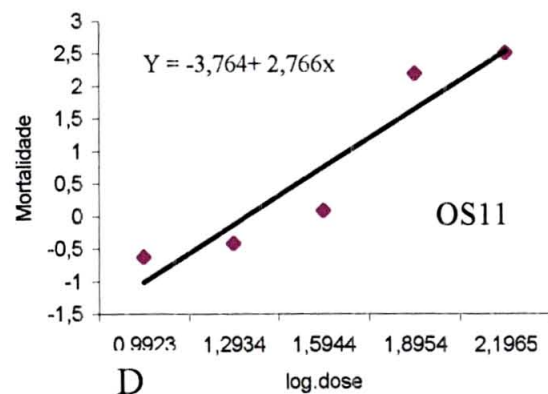
A



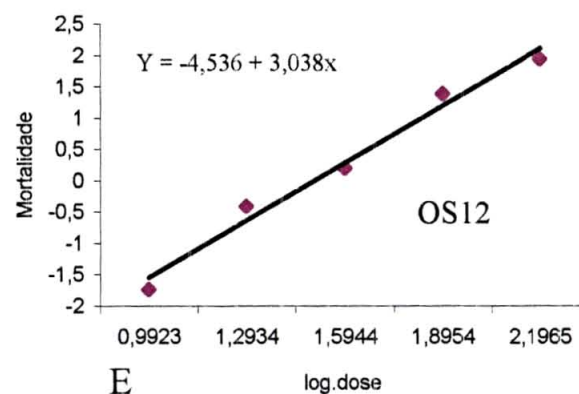
B



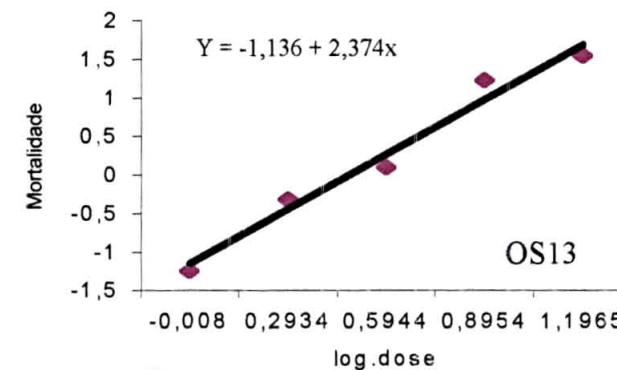
C



D



E



F

Figura 4 Mortalidade de adultos de populações de *Oryzaephilus surinamensis*, submetidas a diferentes concentrações de deltametrina ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), em papel filtro impregnado, em 5 repetições, a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e UR de $65 \pm 5\%$. Passo Fundo, RS, 2003.

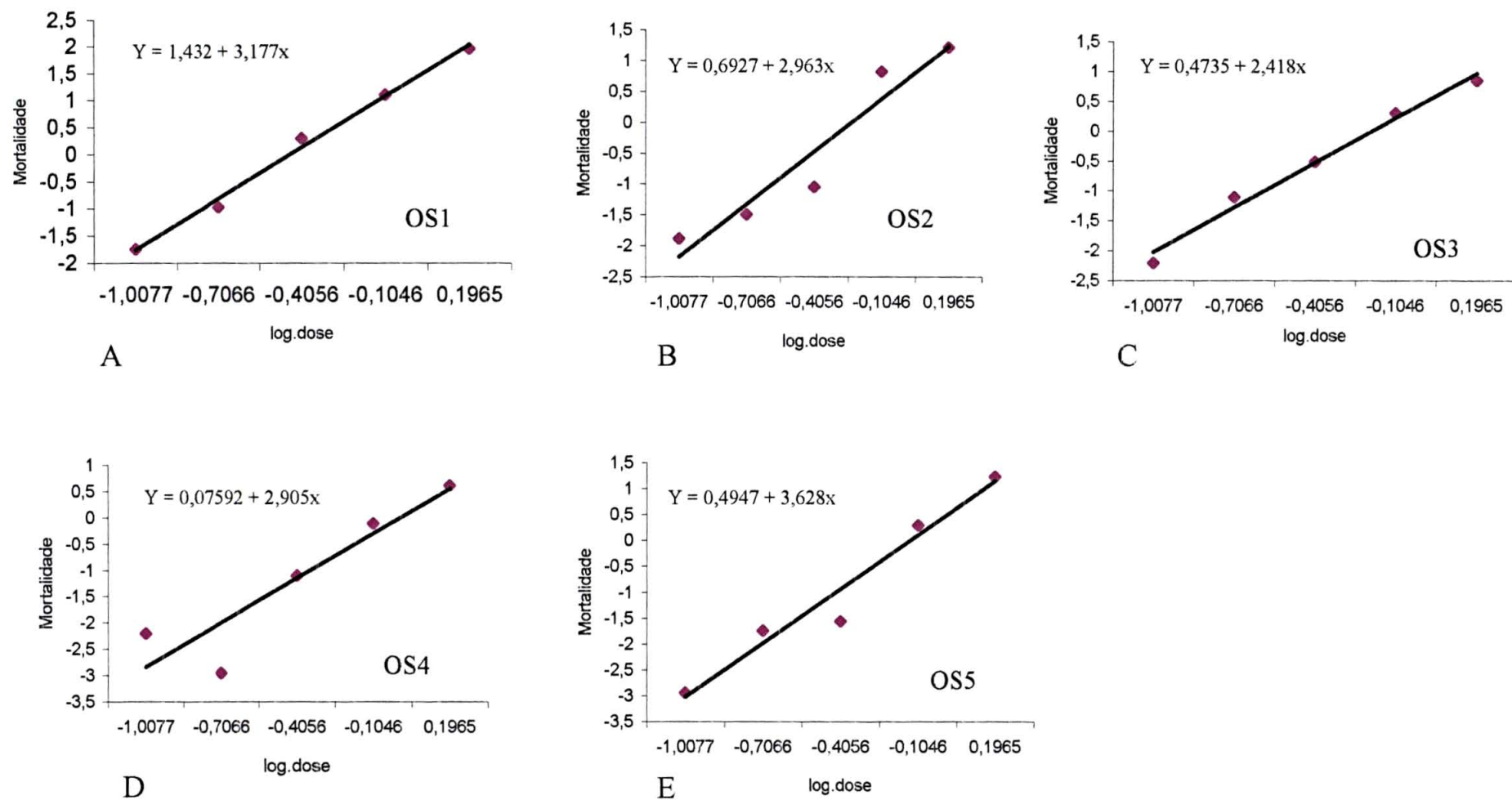


Figura 5 Mortalidade de adultos de populações de *Oryzaephilus surinamensis*, submetidas a diferentes concentrações de pirimifós-metil ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), em papel filtro impregnado, em 5 repetições, a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e UR de $65 \pm 5\%$. Passo Fundo, RS, 2003.

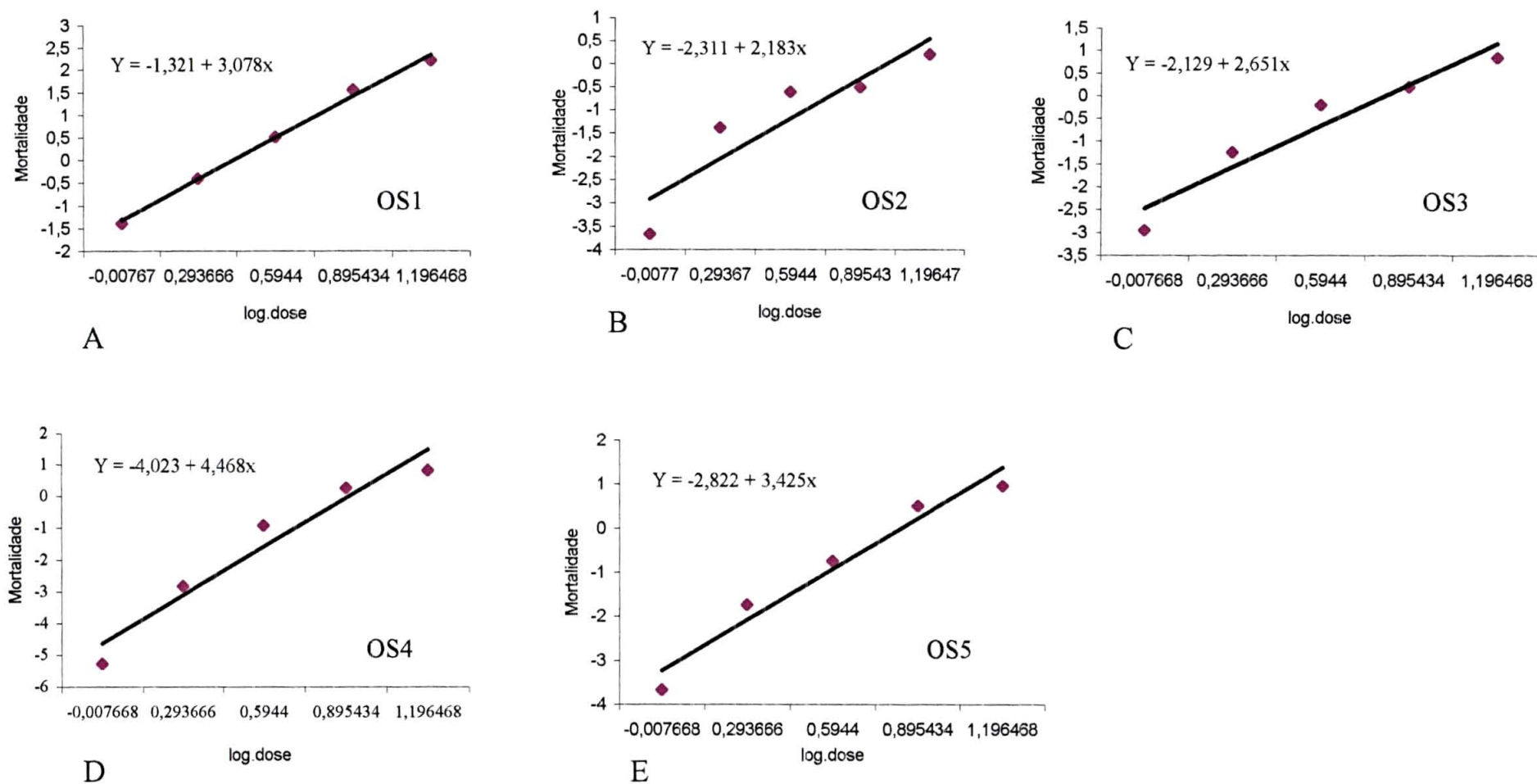


Figura 6 Mortalidade de adultos de populações de *Oryzaephilus surinamensis*, submetidas a diferentes concentrações de bifentrina ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), em papel filtro impregnado, em 5 repetições, a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e UR de $65 \pm 5\%$. Passo Fundo, RS, 2003.

2.4 Referências Bibliográficas

- Anônimo (1974) Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pest to pesticides: Tentative method for adults of some major beetle pest of stored cereals with malathion or lindane - FAO Method N° 15. *FAO Plant Protection Bulletin* **22**, 127-137.
- Barson, G., Fleming, D.A. & Allan, E. (1992) Laboratory assessment of the behavioural responses of residual populations of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae) to the contact insecticide pirimiphos-methyl by linear logistic modelling. *Journal of Stored Products Research* **28**, 161-170.
- Brun, L.O. & Attia, F.I. (1983) Resistance to lindane, malathion and fenitrothion in coleopterous pests of stored products in New Caledonia. *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society* **24**, 211-215.
- Champ, B.R. & Dyte, C.E. (1976) *Informe de la prospeccion mundial de la FAO sobre susceptibilidad a los inseticidas de las plagas de granos almacenados*. 356 pp. Roma.
- Collins, P.J. (1985) Resistance to grain protectants in field populations of the sawtoothed grain beetle in Southern Queensland. *Aust. J. Exp. Agric.* **25**, 683-686.
- Collins, P.J., Lambkin, T.M., Bridgeman, B.W. & Pulvirenti, C. (1993) Resistance to grain-protectant insecticides in coleopterous pests of stored cereals in Queensland, Australia. *Journal of Economic Entomology* **86**, 239-245.

- Crawley, M.J. (1993) *Glim for ecologists*. 379 pp. Blackwell Scientific Publications. Oxford, United Kingdom.
- Ding, W., Wang, J., Zhao, Z. & Tsai, J.H. (2002) Effects of controlled atmosphere and DDVP on population growth and resistance development by the psocid, *Liposcelis bostrychophila* Badonnel (Psocoptera: Liposcelididae). *Journal of Stored Products Research* **38**, 229-237.
- Herron, G.A. (1990) Resistance to grain protectants and phosphine in coleopterous pests of grain stored on farms in New South Wales. *Journal of the Australian Entomological Society* **29**, 183-189.
- Lorini, I. (2001) *Manual Técnico para o Manejo Integrado de Pragas de Grãos de Cereais Armazenados*. 80 pp. Embrapa Trigo. Passo Fundo, RS.
- Lorini, I. & Beckel, H.S. (2002) Mecanismos de resistência das pragas de grãos armazenados. In *Armazenagem de Grãos*, ed. I. Lorini, L. H. Miike & V. M. Scussel, pp. 555-568. Bio Geneziz, Campinas, SP.
- Lorini, I. & Galley, D.J. (1998) Relative effectiveness of topical, filter paper and grain applications of deltamethrin, and associated behaviour of *Rhyzopertha dominica* (F.) strains. *Journal of Stored Products Research* **34**, 377-383.
- Lorini, I. & Galley, D.J. (1999) Deltamethrin resistance in *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae), a pest of stored grain in Brazil. *Journal of Stored Products Research* **35**, 37-45.

- Lorini, I. & Galley, D.J. (2001) The cross-resistance spectrum in deltamethrin resistance strains of *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). *Neotropical Entomology* **30**, 321-325.
- Muggleton, J. (1983) Relative fitness of malathion-resistant phenotypes of *Oryzaephilus surinamensis* L. (Coleoptera: silvanidae). *Journal of Applied Ecology* **20**, 245-254.
- Superintendência de Controle de Endemias (2003) Disponível em: <<http://www.sucen.sp.gov.br>>. Acesso em 08 dez. 2003
- Taylor, C.E. & Georgiou, G.P. (1982) Influence of pesticide persistence in the evolution of resistance. *Environmental Entomology* **11**, 746-750.
- Watson, E. & Barson, G. (1996) A laboratory assessment of the behavioural responses of three strains of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae) to three insecticides and the insect repellent N,N- diethyl-m-toluamide. *Journal of Stored Products Research* **32**, 59-67.

CAPÍTULO 3

EFEITO DO SINERGISTA BUTÓXIDO DE PIPERONILA NA RESISTÊNCIA DE *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (COLEOPTERA: SILVANIDAE)

Resumo – A utilização de sinergistas é uma importante ferramenta para determinar os mecanismos de resistência envolvidos em uma espécie de inseto. Nesta pesquisa, o sinergista butóxido de piperonila (PBO) foi usado, em diferentes proporções, para avaliar a contribuição relativa de enzimas oxidases no metabolismo do inseticida organofosforado fenitrotiom e do piretróide deltametrina, em quatro populações de *Oryzaephilus surinamensis*: OS1 (suscetível) e OS2, OS3 e OS4 (resistentes). O sinergista aumentou, significativamente, a toxicidade da deltametrina nas populações resistentes, indicando que as oxidases exercem uma importante função na resistência a este inseticida. Para o fenitrotiom, o PBO apresentou um efeito antagonista, diminuindo significativamente a toxicidade do inseticida em todas as populações, indicando que este sinergista não é o mais apropriado para a mistura com compostos organofosforados.

Palavras-chave - *Oryzaephilus surinamensis*, butóxido de piperonila, deltametrina, fenitrotiom, sinergismo

Abstract – The use of synergists is an important tool to determine resistance mechanisms in insect species. In this research, the synergist piperonyl butoxide (PBO) was used, in different proportions, to evaluate the relative contribution of oxidase enzymes in the metabolism of the organophosphorous insecticide fenitrothion and the pyrethroid deltamethrin, on four *Oryzaephilus surinamensis* strains: OS1 (susceptible) and OS2, OS3 and OS4 (resistants). The synergist increased deltamethrin toxicity significantly in resistant strains, indicating that oxidases play an important role in deltamethrin resistance. On the other hand, PBO showed antagonistic effect to fenitrothion, reducing its toxicity significantly, indicating that this synergist is not adequate for mixtures with organophosphorous compounds.

Keywords - *Oryzaephilus surinamensis*, piperonyl butoxide, deltamethrin, fenitrothion, synergism

3.1 Introdução

No Brasil, a espécie *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae) aparece praticamente em todas as unidades armazenadoras, onde causa a deterioração de grãos (Lorini, 2001).

Testes desenvolvidos com populações da praga, procedentes da região sul do Brasil (Capítulo 2), detectaram níveis de resistência a inseticidas organofosforados e piretróides, os quais são amplamente utilizados para o controle das pragas de produtos armazenados. Entretanto, esses testes não determinam como se deve manejar as populações de pragas resistentes e, para desenvolver novas estratégias de controle da praga, é imprescindível entender melhor a origem e o desenvolvimento da resistência.

Em geral, os mecanismos de resistência de insetos a inseticidas são incluídos em três categorias: a) redução da penetração do inseticida pela cutícula do inseto; b) redução da sensibilidade no sítio de ação do inseticida pelo sistema nervoso; e c) detoxificação ou metabolização do inseticida por enzimas (Narahashi, 1983; Oppenoorth, 1985; Anônimo, 1986; Hemingway, 2000; Lorini & Beckel, 2002). O comportamento dos insetos frente a inseticidas é um quarto mecanismo que recentemente vem sendo estudado, e tem sido verificado pela repelência de inseticidas exercida sobre as pragas (Hodges & Meik, 1986), e por alterações de comportamento provocadas pelos químicos (Lorini & Galley, 1998; Beckel, 2000).

As barreiras de penetração nos insetos são um mecanismo de resistência viável, sendo que a redução da penetração do inseticida pela cutícula é efetiva quando associada ao mecanismo de defesa metabólico (Matsumura, 1983; Chen & Mayer, 1985). A base genética deste mecanismo está relacionada a genes secundários, como o gene *pen* da mosca doméstica. Este é localizado no cromossomo III e é um gene recessivo que normalmente confere pouca ou nenhuma resistência na ausência de outro

mecanismo de resistência, e, provavelmente, não causa por si só significantes falhas de controle (Plapp & Wang, 1983; Roush & Daly, 1990).

As duas últimas categorias, no entanto, são as mais importantes e incluem, por sua vez, mecanismos específicos. As alterações no sítio de ação do inseticida pelo sistema nervoso incluem a enzima acetilcolinesterase para os organofosforados e carbamatos, os canais de sódio nas membranas dos nervos para organoclorados e piretróides, e os receptores GABA para os ciclodienos. A resistência devido à acetilcolinesterase alterada ocorre mediante modificações qualitativas no centro catalítico da enzima ou próximo ao centro (Hemingway, 1994; Guedes *et al.*, 1997c), o que caracteriza uma redução na taxa de reação entre os compostos organofosforados e a acetilcolinesterase (Oppenoorth, 1985; Hemingway, 1994).

Na mosca doméstica, o gene responsável pela acetilcolinesterase alterada está localizado no cromossomo II (Plapp & Wang, 1983; Hama, 1983; Byrne & Devonshire, 1993). Fournier *et al.* (1992) mostraram que a alteração dessa enzima em uma população de mosca doméstica resistente ao inseticida malation ocorre devido a uma mutação, onde a substituição de adenina por timina no gene da acetilcolinesterase resulta na substituição da fenilalanina por tirosina na posição 368. Mutero *et al.* (1992) constataram que a substituição da tirosina na posição 109 por outros resíduos também modifica a sensibilidade da acetilcolinesterase à inibição por carbamatos e organofosforados. O sítio alvo de inseticidas organoclorados e piretróides tem sido identificado como os canais de sódio na membrana do neurônio, afetando a despolarização da membrana e induzindo a repetitivas descargas que resultam numa hiperatividade do sistema nervoso do inseto.

Os possíveis mecanismos ligados à baixa sensibilidade nervosa a inseticidas em populações resistentes incluem: ligações reduzidas do inseticida com a membrana

nervosa, um grau menor de modificação do canal de sódio pelos inseticidas e modificação das propriedades elétricas da membrana para reduzir as respostas repetitivas (Narahashi, 1983). Na resistência por "knockdown" na mosca doméstica, existe uma demora na resposta do neurônio do inseto aos inseticidas piretróides e ao DDT (Chang & Plapp, 1983; Miller *et al.*, 1983). O mecanismo neurotóxico *kdr* envolve uma seletiva modificação na sensibilidade dos canais de sódio. (Plapp & Wang, 1983). Esses autores registraram que o gene *kdr* é recessivo e inclui o alelo *super-kdr*, que confere maior resistência que o gene *kdr*. Williamson *et al.* (1997) sugeriram que o *kdr*, na mosca doméstica, é originado pela substituição de um único aminoácido, leucina por fenilalanina, na região do segmento II S6 do canal de sódio, enquanto uma alteração adicional de metionina por treonina na proximidade da ligação II S4 - II S5 é responsável pelo aumento da resistência do *super kdr*. Martin *et al.* (2000) encontraram, em *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae), que o *kdr* é originado pela substituição de um aminoácido, mas na região do segmento III S6 do canal de sódio, enquanto uma substituição de alanina por valina na proximidade da ligação III S4 – III S5 confere o aumento da resistência do *super kdr*.

E por fim, o gene que confere resistência aos inseticidas ciclodienos está localizado no cromossomo IV (Plapp & Wang, 1983), mas as alterações associadas a esse mecanismo ainda não são muito conhecidas (Hemingway, 1994).

O metabolismo ou detoxificação é, provavelmente, o mecanismo de resistência de insetos aos inseticidas mais estudado. Este mecanismo permite ao inseto modificar ou detoxificar o inseticida a uma taxa suficiente o bastante para prevenir a ação no sítio alvo (Fukuto & Mallipudi, 1983). A degradação do inseticida pode ocorrer por vários processos metabólicos nos quais o produto é convertido em uma forma não tóxica ou mesmo eliminado rapidamente do corpo do inseto. Várias enzimas e sistemas

enzimáticos estão envolvidos, como as esterases, oxidases, transferases e outras enzimas que aumentam sua eficiência ou sua quantidade nas populações resistentes (Devonshire & Moores, 1982; Oppenoorth, 1984; Yu & Nguyen, 1992; Hemingway, 2000). As oxidases e transferases são enzimas ubíquas que estão comumente envolvidas na detoxificação de numerosos compostos. Já as esterases são de maior importância, especificamente na detoxificação de organofosforados (Conyers *et al.*, 1998). A resistência associada com esses processos é controlada primariamente por genes localizados no cromossomo II, na mosca doméstica, e parece ser herdada de uma maneira intermediária a incompletamente dominante (Plapp & Wang, 1983).

Certamente a evolução desses mecanismos de resistência sofreu e sofre ainda pressão seletiva, representada, de um modo geral, pelo uso indiscriminado de inseticidas, permitindo que mutações recorrentes somadas a genótipos resistentes possam ser mantidos por esse processo, acumulando-se ao nível de populações (Almeida *et al.*, 1978).

A interação entre mecanismos de detoxificação metabólica e espécies de insetos resistentes a inseticidas pode ser constatada através do uso de sinergistas (Oppenoorth *et al.*, 1977; Ishaaya & Casida, 1983; Wilkinson, 1983; Hinks & Spurr, 1991), os quais representam uma importante ferramenta de laboratório (Raffa & Priester, 1985).

A ação do sinergista minimiza a quantidade de inseticida químico necessária para o controle de insetos, pois age como um substrato alternativo, poupando o inseticida da detoxificação, ou reage com outro sítio no sistema enzimático, prevenindo a detoxificação do inseticida (Casida, 1970), aumentando assim a letalidade dos mesmos nas populações resistentes (Brindley & Selim, 1984). Além disso, os sinergistas podem minimizar a contaminação ambiental dos resíduos de inseticidas

persistentes; e preservar insetos benéficos quando misturados com inseticidas como indicaram Plapp (1979), Rajakulendran & Plapp (1982) e Raffa & Priester (1985).

A resistência metabólica pode ser suprimida por vários sinérgistas, os quais bloqueiam diferentes enzimas de detoxificação envolvidas em resistência a inseticidas. A acetilcolinesterase insensível pode ser suprimida por diferentes inibidores de carbamatos e organofosforados (Hama, 1983; Byrne & Devonshire, 1993). Para enzimas oxidases multifuncionais (MFO) os inibidores mais importantes são o butóxido de piperonila (PBO), sesamex, sulfóxido, N-(2-exileílico)-8,9,10-trinoborn-5-ene-2,3-dicarboxamida (MGK 264), N-declimidazole e N,N-dibutil-4-clorobenzeno-sulfonamida (WARF-antiresistente). Inibidores para carboxilesterases são S,S,S-tributylfosforotritioato (TBPT ou DEF), 0,0,0-trifenilfosfato (TPP), 5-benzil-0,0-diisoprilfosforotioato (IBP) e fosfato cíclico fenilsaligenin (PSCP). Fosfatases e amidases são inibidas por DEF, TPP, e IBP. Iodeto de metila (CH_3I), t-fenilbutenona e dietilmaleato estão envolvidos na inibição de transferases. Desidroclorinasas são bloqueadas por clorfenetol (DMC), bis (p- clorofenil) trifluorometilcarbinol (FDMC) e WARF-antiresistente. Finalmente 1,1,1-tricloro-2,3-epóxiopropano (ETP) e 1,2-epóxi-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno (ETN) estão envolvidos na inibição de epóxido hidrase (Casida, 1970; Ishaaya & Casida, 1983; Raffa & Priester, 1985; Horowitz *et al.*, 1988; Scott, 1990).

Os sinérgistas têm sido intensamente empregados na tentativa de superar o problema de resistência e ajudar a controlar pragas no campo e, particularmente, em ambientes de grãos armazenados. Em algumas espécies de coleópteros de produtos armazenados houve comprovação da resistência bioquímica, como indicado por Subramanyam *et al.* (1989) utilizando inseticidas combinados com sinérgistas. Estes autores observaram que a enzima carboxilesterase estava envolvida na detoxificação de

malatiom em adultos resistentes de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae); enquanto que oxidases e esterases são responsáveis pela detoxificação de clorpirifós-metil em adultos de *O. surinamensis*.

Lorini & Galley (2000) mostraram que o sinergista PBO aumentou a toxicidade do inseticida deltametrina em uma maneira dose-dependente, em todas as proporções testadas em populações resistentes de *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae), indicando que enzimas oxidases (MFO) são importantes na detoxificação desse inseticida. Entretanto, para populações suscetíveis, a adição de PBO aumentou a toxicidade somente nas maiores proporções testadas. Esses autores também testaram o sinergista DEF com deltametrina, nas mesmas populações de *R. dominica*, e não encontraram um efeito sinergista significativo, constatando que enzimas esterases possivelmente não estejam envolvidas na resistência a deltametrina em *R. dominica*.

Guedes *et al.* (1997a) demonstraram que a atividade específica da acetilcolinesterase diferiu significativamente entre populações resistentes e suscetíveis de *R. dominica*, indicando que a atividade aumentada da acetilcolinesterase parece estar associada com a resistência a organofosforados. E, com relação à resistência bioquímica aos piretróides, estudos de Collins (1990), com a espécie *T. castaneum*, indicam que o aumento do metabolismo enzimático na molécula do inseticida envolve oxidação e/ou hidrólise por ésteres.

Assim, informações sobre a toxicologia de inseticidas químicos e a identificação de mecanismos de resistência, no sentido de distinguir um sistema enzimático de outro, podem ser obtidas por investigações apropriadas com sinergistas. O butóxido de piperonila tem sido usado como sinergista com inseticidas organofosforados e piretróides para controlar pragas de grãos armazenados com excelentes resultados

(Ardley, 1976; Bengston *et al.*, 1983; Samson *et al.*, 1990; Daglish *et al.*, 1995; Lorini & Galley, 2000).

A proposta deste estudo foi de investigar os mecanismos de resistência em populações de *O. surinamensis* a inseticidas organofosforados e piretróides, com base em bioensaios utilizando o sinergista butóxido de piperonila.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Populações de *O. surinamensis*

Quatro populações de *O. surinamensis* foram utilizadas nos experimentos: OS1, OS2 OS3 e OS4, coletadas em 1998, nos municípios de Passo Fundo-RS, Ubatã-PR, Santo Ângelo-RS e Saldanha Marinho-RS, respectivamente.

A população OS1 foi considerada suscetível, e as populações OS2, OS3 e OS4, resistentes aos inseticidas fenitrotiom e deltametrina, conforme determinado no Capítulo 2.

Foram utilizados indivíduos da décima geração (F_{n+10}) das populações OS1, OS2 e OS3, mantidos em grãos de trigo triturados ao grau 20, conforme descrito no Capítulo 1. Para a população OS4, indivíduos da nona geração (F_{n+9}) foram utilizados para os testes com fenitrotiom, e da oitava geração (F_{n+8}) para os testes com deltametrina.

3.2.2 Sinergista e bioensaios

Cada população foi testada sobre papel filtro impregnado com cinco concentrações de fenitrotiom (Sumigran 500 CE) e cinco de deltametrina (Decis 25 CE), separadamente. Cinco proporções de PBO (1:0, 1:5, 1:10, 1:15 e 1:20) foram combinadas com cada concentração, para cada inseticida.

Os bioensaios foram executados seguindo o método recomendado pela FAO (Anônimo, 1974), com algumas modificações para a espécie em estudo. Cada população foi submetida a cinco tratamentos com o inseticida e um controle sem inseticida. Os inseticidas fenitrotiom 500 g i.a./L (Sumigran 500 CE) e deltametrina 25 g i.a./L (Decis 25 CE) foram diluídos em éter de petróleo, juntamente com o sinergista PBO, para as concentrações estabelecidas, e 1,0 mL da concentração foi distribuído sobre o papel filtro de 9 cm de diâmetro, colocado em placas de Petri, em quatro repetições. Após a evaporação do solvente, 10 insetos adultos, não sexados, de 1-20 dias de idade, foram liberados no interior de cada placa.

O experimento foi realizado em sala climatizada, em temperatura de $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar de $65 \pm 5\%$.

3.2.3 Avaliação dos dados e análise estatística

A avaliação da mortalidade, visando estabelecer as concentrações letais (CL_{50}) para cada população, foi feita pela contagem do número de insetos vivos e mortos 24 h após o tratamento, considerando-se mortos os insetos que não puderam caminhar normalmente durante um período de observação de 2 minutos. Para determinação da CL_{50} para cada população, os resultados de mortalidade dos bioensaios foram analisados pelo programa estatístico GLIM, Royal Statistical Society, versão 3.77 (Crawley, 1993). A razão entre as CL_{50} das diferentes proporções do sinergista e o inseticida, foram calculadas.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Fenitrotiom + Butóxido de Piperonila

O PBO adicionado ao inseticida fenitrotiom aumentou a dose letal média nas populações suscetível e resistentes, diminuindo muito a toxicidade do inseticida e demonstrando a ausência do efeito sinergista (Tabela 1). As relações entre a CL_{50} sem PBO dividida pela CL_{50} com o PBO indicaram um efeito antagonista, resultando na eliminação dos efeitos nocivos do inseticida.

Os compostos organofosforados são conhecidamente metabolizados por enzimas esterases (Kao *et al.*, 1984; Guedes *et al.*, 1997b; Guedes *et al.*, 1997c). Estudos de Conyers *et al.* (1998) demonstraram uma superprodução de esterase em uma população de *O. surinamensis* resistente aos organofosforados malatim e fenitrotiom. Seguindo este raciocínio, pode-se inferir que a ausência do efeito sinergista do PBO indica que o mesmo não é um inibidor efetivo de esterases nesta espécie. Entretanto, em estudos de Attia & Frecker (1984), com populações de *O. surinamensis* resistentes a inseticidas organofosforados, o sinergista PBO sinergizou os inseticidas malatim, fenitrotiom, clorpirifós-metil e pirimifós-metil testados.

Estudos de Guedes & Zhu (1998) demonstraram que o PBO apresentou um efeito antagonista ao inseticida organofosforado malatim em populações resistente e suscetível de *R. dominica*. Segundo os autores, o malatim precisa ser ativado pelo citocromo P450 para produzir malaoxon e então inibir a acetilcolinesterase. No exemplo mencionado, o efeito antagonista do PBO ao malatim inibiu a ativação do sistema.

É importante salientar que para controlar pragas de grãos armazenados, misturas de inseticidas piretróides, que contêm o sinergista PBO, e inseticidas organofosforados são utilizadas com frequência. Considerando-se os resultados encontrados neste trabalho, que indicam que PBO exerce um efeito antagonista quando associado ao

organofosforado fenitrotiom, pode-se inferir que misturas de inseticidas piretróides e organofosforados para controlar *O. surinamensis* apresentarão eficiência reduzida.

Segundo Wilkinson (1983), a avaliação do papel de oxidação no metabolismo de compostos organofosforados é difícil pelo fato de que em muitos casos, os produtos gerados pela ação de oxidases são os mesmos resultantes da ação de outros tipos de enzimas, como as esterases e transferases.

Jao & Casida (1974) indicam que o sinergista DEF é o melhor de uma série de sinergistas para compostos organofosforados devido ao seu forte efeito inibitório sobre esterases. Assim, para aprofundar os estudos aqui apresentados, sugere-se investigar o potencial das enzimas esterases na detoxificação de inseticidas organofosforados em *O. surinamensis*.

3.3.2 Deltametrina + Butóxido de Piperonila

O PBO aumentou a toxicidade da deltametrina em todas as proporções nas populações resistentes. Entretanto, para a população suscetível OS1, a adição do sinergista não conferiu relação de toxicidade, pois na combinação 1:15 a relação entre a CL_{50} sem PBO dividida pela CL_{50} com PBO foi de 5,4 vezes enquanto que na proporção 1:20 foi somente de 1,5 vezes (Tabela 2). Este resultado poderia ser esperado, pois, presume-se que os indivíduos desta população tenham expressado sua tolerância normal ao inseticida. O PBO conferiu maiores relações de toxicidade nas populações resistentes, e a maior relação entre a CL_{50} sem PBO dividida pela CL_{50} com PBO foi encontrada na população OS2, onde a relação de sinergismo na proporção 1:20 foi de 42,8 vezes (Tabela 2).

Resultado similar foi encontrado por Lorini & Galley (2000), que testaram o sinergista PBO com deltametrina em populações suscetíveis e resistentes de *R.*

dominica, não encontrando alteração de toxicidade para as populações suscetíveis, e demonstrando efeito sinergista do PBO nas populações resistentes.

A adição do PBO à deltametrina reduziu efetivamente a dose letal média das populações resistentes de *O. surinamensis* testadas. A proporção 1:20 de deltametrina e sinergista reduziu a razão entre as CL_{50} da população suscetível (OS1) e da resistente (OS3) de 18 para 2 vezes. Como a resistência não foi completamente suprimida, é possível inferir que outro mecanismo de resistência, além do metabolismo por oxidases, possa também estar envolvido com essas populações. Além disso, os indivíduos testados já poderiam ter desenvolvido resistência às combinações de PBO e deltametrina, já que o PBO vem sendo adicionado ao inseticida deltametrina na proporção 1:10 em formulações comerciais (K-OBIOL 25 CE). Esse tratamento é feito em grãos armazenados para reduzir a taxa de aplicação sobre populações suscetíveis e também como uma medida mais econômica, com a vantagem de reduzir os níveis de resíduos nos grãos.

Como o PBO sinergizou o inseticida deltametrina neste experimento e, já que o mesmo, conhecidamente, bloqueia oxidases multifuncionais (MFO) (Casida, 1970; Ishaaya & Casida, 1983), conclui-se que essas enzimas exercem uma importante função na resistência à deltametrina nas populações de *O. surinamensis* avaliadas neste estudo. Contudo, para interpretar adequadamente a resistência, mais informações são requeridas além de experimentos com outros sinergistas. No entanto, a despeito das limitações discutidas anteriormente, o sinergismo pode ser uma ferramenta valiosa para determinar os diferentes mecanismos metabólicos de resistência.

Tabela 1 Parâmetros de mortalidade para adultos de *Oryzaephilus surinamensis* das populações OS1, OS2, OS3 (F_{n+10}) e OS4 (F_{n+9}), testadas com fenitrotiom (Fe) + diferentes proporções de butóxido de piperonila (PBO), a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e UR de $65 \pm 5\%$. Valores da CL_{50} em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de fenitrotiom. Passo Fundo, RS, 2003.

Proporção Fe + PBO	CL_{50} (95% lim. conf.) ¹	a	EP_a	b	EP_b	Razão ²
OS1:						
1+00	0,4653 (0,036-1,017) A	0,5063	0,2664	1,524	0,4464	-
1+05	0,2724 (0,000-0,842) A	0,6654	0,2696	1,178	0,4295	1,7
1+10	9,8650 (1,673-18,49) B	-1,2990	0,5951	1,307	0,3794	-21,2
1+15	15,650 (0,000-38,66) C	-0,8613	0,5585	0,721	0,3423	-33,6
1+20	19,640 (11,86-27,74) C	-2,7170	0,6276	2,101	0,4043	-42,2
OS2:						
1+00	1,556 (1,128-1,979) B	-0,6873	0,2761	3,578	0,5680	-
1+05	1,168 (0,218-2,147) A	-0,0845	0,2481	1,255	0,3703	1,3
1+10	20,29 (7,365-34,24) C	-1,6780	0,5776	1,284	0,3588	-13,0
1+15	37,55 (16,29-81,68) C	-1,6680	0,5706	1,059	0,3466	-24,1
1+20	87,87 (47,71-422,8) D	-2,1330	0,5949	1,097	0,3536	-56,4
OS3:						
1+00	2,721 (2,028-3,522) A	-1,276	0,2855	2,936	0,4501	-
1+05	8,197 (4,856-23,73) B	-1,182	0,2742	1,294	0,3606	-3,0
1+10	66,93 (44,53-123,8) C	-2,102	0,4164	1,151	0,2489	-245,9
1+15	226,4 (118,3- 1148,0) C	-2,524	0,4544	1,072	0,2648	-832,0
1+20	192,9 (101,0-1044,0) C	-2,248	0,4377	0,983	0,2572	-708,9
OS4:						
1+00	2,265 (1,545-3,050) A	-0,875	0,2667	2,464	0,4230	-
1+05	6,395 (4,813-9,076) B	-2,091	0,3362	2,595	0,4295	-2,8
1+10	84,72 (61,91-133,2) C	-3,161	0,4583	1,640	0,2677	-37,4
1+15	129,9 (88,97-245,9) C	-3,343	0,4819	1,581	0,2770	-57,3
1+20	74,65 (58,65-101,3) C	-4,032	0,4957	2,153	0,2867	-32,9

¹ CL_{50} seguidas com a mesma letra não são significativamente diferentes ($P > 0.05$) dentro da mesma população. As séries logit log-dose foram comparadas pelo teste F.

² Razão = CL_{50} sem PBO dividida pela CL_{50} com PBO, dentro de cada população.

a = interseção b = inclinação EP = Erro Padrão

Tabela 2 Parâmetros de mortalidade para adultos de *Oryzaephilus surinamensis* das populações OS1, OS2, OS3 (F_{n+10}) e OS4 (F_{n+8}), testadas com deltametrina (Del) + diferentes proporções de butóxido de piperonila (PBO), a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e UR de $65 \pm 5\%$. Valores da CL_{50} em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de deltametrina. Passo Fundo, RS, 2003.

Proporção Del + PBO	CL_{50} (95% lim. conf.) ¹	a	EP_a	b	EP_b	Razão ²
OS1:						
1+00	3,344 (2,258-4,771) BC	-1,0590	0,2692	2,019	0,3851	-
1+05	1,723 (1,003-2,447) AB	-0,5048	0,2567	2,136	0,4136	1,9
1+10	4,722 (2,795-8,921) C	-0,9164	0,2615	1,359	0,3563	0,7
1+15	0,611 (0,024-1,389) A	0,2503	0,2531	1,172	0,3872	5,4
1+20	2,232 (1,536-2,987) ABC	-0,8844	0,2676	2,536	0,4290	1,5
OS2:						
1+00	19,55 (13,950-25,41) E	-3,854	0,7078	2,985	0,4757	-
1+05	11,54 (6,7610-15,95) D	-2,995	0,7352	2,820	0,5218	1,7
1+10	2,316 (1,1840-3,585) C	-0,567	0,2526	1,556	0,3683	8,4
1+15	0,906 (0,1037-1,794) B	0,052	0,2494	1,221	0,3762	21,5
1+20	0,456 (0,0067-1,160) A	0,392	0,2573	1,150	0,3977	42,8
OS3:						
1+00	61,19 (45,96-86,58) D	-4,580	0,7306	2,564	0,4253	-
1+05	24,36 (18,88-30,49) C	-4,978	0,7746	3,590	0,5147	2,5
1+10	8,026 (6,345-10,53) AB	-3,039	0,4390	3,360	0,4937	7,6
1+15	10,33 (7,835-14,93) B	-2,858	0,4261	2,819	0,4644	5,9
1+20	6,458 (4,048-11,78) A	-1,201	0,2973	1,482	0,3615	9,4
OS4:						
1+00	47,58 (36,89-62,41) C	-5,062	0,7569	3,018	0,4507	-
1+05	15,71 (9,828-21,49) B	-3,035	0,6737	2,537	0,4538	3,0
1+10	3,829 (3,065-4,729) A	-2,297	0,3765	3,939	0,5353	12,4
1+15	3,360 (2,367-4,509) A	-1,301	0,3061	2,471	0,4165	14,1
1+20	3,438 (2,427-4,619) A	-1,320	0,3066	2,460	0,4150	13,8

¹ CL_{50} seguidas com a mesma letra não são significativamente diferentes ($P > 0.05$) dentro da mesma população. As séries logit log-dose foram comparadas pelo teste F.

² Razão = CL_{50} sem PBO dividida pela CL_{50} com PBO, dentro de cada população.

a = interseção b = inclinação EP = Erro Padrão

3.4 Referências Bibliográficas

- Almeida, J.R., Mizuguchi, Y. & Dos Santos, C.E. (1978) Sistemas enzimáticos de *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera, Gelechiidae) e algumas considerações sobre resistência a inseticidas. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 7, 193-198.
- Anônimo (1974) Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pest to pesticides: Tentative method for adults of some major beetle pest of stored cereals with malathion or lindane - FAO Method N° 15. *FAO Plant Protection Bulletin* 22, 127-137.
- Anônimo (1986) Genetic, biochemical, and physiological mechanisms of resistance to pesticides. In *Pesticide resistance: strategies and tactics for management*, ed. National Research Council, pp. 45-53. National Academy Press, Washington, United States of America.
- Ardley, J.H. (1976) Synergized bioresmethrin as a potential grain protectant. *Journal of Stored Products Research* 12, 253-259.
- Attia, F.I. & Frecker, T. (1984) Cross-resistance spectrum and synergism studies in organophosphorus-resistant strains of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Cucugidae) in Australia. *Journal of Economic Entomology* 77, 1367-1370.
- Beckel, H. S. (2000) Comportamento de *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae) em Relação à Resistência ao Inseticida Deltamethrin. Dissertação de Mestrado. 63 p.

- Bengston, M., Davies, R.A.H., Desmarchelier, J.M., Henning, R., Murray, W., Simpson, B.W., Snelson, J.T., Sticka, R. & Wallbank, B.E. (1983) Organophosphorothioates and synergised synthetic pyrethroids as grain protectants on bulk wheat. *Pesticide Science* **14**, 373-384.
- Brindley, W.A. & Selim, A.A. (1984) Synergism and antagonism in the analysis of insecticide resistance. *Environmental Entomology* **13**, 348-353.
- Byrne, F.J. & Devonshire, A.L. (1993) Insensitive acetylcholinesterase and esterase polymorphism in susceptible and resistant populations of the tobacco whitefly *Bemisia tabaci* (Genn.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **45**, 34-42.
- Casida, J.E. (1970) Mixed-function oxidase involvement in the biochemistry of insecticide synergists. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **18**, 753-772.
- Chang, C.P. & Plapp, F.W.J. (1983) DDT and pyrethroids: receptor binding in relation to knockdown resistance (kdr) in the house fly. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **20**, 86-91.
- Chen, A.C. & Mayer, R.T. (1985) Insecticides: effects on the cuticle. In *Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology*, ed. G. A. Kerkut & L. I. Gilbert, pp. 57-77. Pergamon Press, Oxford, United Kingdom.
- Collins, P.J. (1990) A new resistance to pyrethroids in *Tribolium castaneum* (Herbst). *Pesticide Science* **28**, 101-115.

- Conyers, C.M., MacNicoll, A.D. & Price, N.R. (1998) Purification and characterisation of an esterase involved in resistance to organophosphorus insecticides in the saw-toothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 435-448.
- Crawley, M.J. (1993) *Glim for ecologists*. 379 pp. Blackwell Scientific Publications. Oxford, United Kingdom.
- Daglish, G.J., Eelkema, M. & Harrison, L.M. (1995) Chlorpyrifos-methyl plus either methoprene or synergized phenothrin for control of coleoptera in maize in Queensland, Australia. *Journal of Stored Products Research* **31**, 235-241.
- Devonshire, A.L. & Moores, G.D. (1982) A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **18**, 235-246.
- Fournier, D., Bride, J.-M., Hoffmann, F. & Karch, F. (1992) Acetylcholinesterase - two types of modifications confer resistance to insecticide. *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 14270-14274.
- Fukuto, T.R. & Mallipudi, N.M. (1983) Suppression of metabolic resistance through chemical structure modification. In *Pest resistance to pesticides: challenges & prospects*, ed. G. P. Georgiou & T. Saito, pp. 557-578. Plenum Press, New York, United States of America.

- Guedes, R.N.C., Kambhampati, S., Dover, B.A. & Zhu, K.Y. (1997a) Biochemical mechanisms of organophosphate resistance in *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) populations from the United State and Brazil. *Bulletin of Entomological Research* **87**, 581-586.
- Guedes, R.N.C. & Zhu, K.Y. (1998) Characterization of malathion resistance in a mexican population of *Rhyzopertha dominica*. *Pesticide Science* **53**, 15-20.
- Guedes, R.N.C., Zhu, K.Y., Dover, B.A. & Kambhampati, S. (1997b) Partial characterization of phosphotriesterases from organophosphate-susceptible and resistant populations of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **57**, 156-164.
- Guedes, R.N.C., Zhu, K.Y., Kambhampati, S. & Dover, B.A. (1997c) An altered acetylcholinesterase conferring negative cross-insensitivity to different insecticidal inhibitors in organohosphate-resistant lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **58**, 55-62.
- Hama, H. (1983) Resistance to insecticides due to reduced sensitivity of acetylcholinesterase. In *Pest Resistance to Pesticides: Challenges and Prospects*, ed. G.P.Georgiou & T.Saito, pp. 299-331. Plenum Press, New York, United States of America.
- Hemingway, J. (1994) Resistencia a los insecticidas y su importancia en el control de la malaria. *Salud Pública* **11**, 7-13.

- Hemingway, J. (2000) The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**, 1009-1015.
- Hinks, C.F. & Spurr, D.T. (1991) The efficacy and cost benefits of binary mixtures of deltamethrin combined with other insecticides or synergists against grasshoppers at two temperatures. *J. Agric. Entomol.* **8**, 29-39.
- Hodges, R.J. & Meik, J. (1986) Lethal and sublethal effects of permethrin on Tanzanian strains of *Tribolium castaneum* (Herbst), *Gnathocerus maxillosus* (F.) *Sitophilus oryzae* (L.) and *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Insect Science Applic.* **7**, 533-537.
- Horowitz, A.R., Toscano, N.C., Yongman, R.R. & Georgiou, G.P. (1988) Synergism of insecticides with DEF in sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology* **81**, 110-114.
- Ishaaya, I. & Casida, J.E. (1983) Pyrethroid detoxification and synergism in insects. In *Pesticide Chemistry: Human Welfare and the Environment. Mode of Action, metabolism and Toxicology*, ed. S. Matsunaka, D. H. Hutson & S. D. Murphy, pp. 307-310. Pergamon, Oxford, United Kingdom.
- Jao, L.T. & Casida, J.E. (1974) Esterase inhibitors as synergists for (+)-trans-chrysanthemate insecticide chemicals. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **4**, 456-464.

- Kao, L.R., Motoyama, N. & Dauterman, W.C. (1984) Studies on hydrolases in various house fly strains and their role in malathion resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **22**, 86-92.
- Lorini, I. (2001) *Manual Técnico para o Manejo Integrado de Pragas de Grãos de Cereais Armazenados*. 80 pp. Embrapa Trigo. Passo Fundo, RS.
- Lorini, I. & Beckel, H.S. (2002) Mecanismos de resistência das pragas de grãos armazenados. In *Armazenagem de Grãos*, ed. I. Lorini, L. H. Miike & V. M. Scussel, pp. 555-568. Bio Geneziz, Campinas, SP.
- Lorini, I. & Galley, D.J. (1998) Relative effectiveness of topical, filter paper and grain applications of deltamethrin, and associated behaviour of *Rhyzopertha dominica* (F.) strains. *Journal of Stored Products Research* **34**, 377-383.
- Lorini, I. & Galley, D.J. (2000) Effect of the synergists piperonyl butoxide and DEF in deltamethrin resistance on strains of *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* **29**, 749-755.
- Martin, R.L., Pittendrigh, B., Liu, J., Reenan, R., Ffrench-Constant, R. & Hanck, D.A. (2000) Point mutations in domain III of a *Drosophila* neuronal Na channel confer resistance to allethrin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**, 1051-1059.
- Matsumura, F. (1983) Penetration, binding and target insensitivity as causes of resistance to chlorinated hydrocarbon insecticides. In *Pest resistance to pesticides*:

- challenges and prospects*, ed. G. P. Georgiou & T. Saito, pp. 367-386. Pergamon Press, Oxford, United Kingdom.
- Miller, T.A., Salgado, V.L. & Irving, S.N. (1983) The kdr factor in pyrethroid resistance. In *Pest resistance to pesticides: challenges and prospects*, ed. G. P. Georgiou & T. Saito, pp. 353-366. Plenum Press, New York, United States of America.
- Mutero, A., Pralavario, M., Simeon, V. & Fournier, D. (1992) Catalytic properties of cholinesterases: importance of tyrosine 109 in *Drosophila* protein. *NeuroReport* **3**, 39-42.
- Narahashi, T. (1983) Resistance to insecticides due to reduced sensitivity of the nervous system. In *Pest resistance to pesticides challenges and prospects*, ed. G. P. Georgiou & T. Saito, pp. 333-352. Plenum Press, New York, United States of America.
- Oppenoorth, F.J. (1984) Biochemistry of insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **22**, 187-193.
- Oppenoorth, F.J. (1985) Biochemistry and genetics of insecticide resistance. In *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology.*, ed. G. A. Kerkut & L. I. Gilbert, pp. 731-773. Pergamon Press, Oxford, United Kingdom.
- Oppenoorth, F.J., Smissaert, H.R., Welling, W., Van Der Pas, L.J.T. & Hitman, K.T. (1977) Insensitive acetylcholinesterase, high glutathione-s-transferase, and

hydrolytic activity as resistance factors in a tetrachlorvinphos-resistant strain of house fly. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 7, 34-47.

Plapp, F.W. (1979) Synergism of pyrethroid insecticides by formamidines against *Heliothis* pests of cotton. *Journal of Economic Entomology* 72, 667-670.

Plapp, F.W. & Wang, T.C. (1983) Genetic origins of insecticide resistance. In *Pest resistance to pesticides: challenges and prospects*, ed. G. P. Georgiou & T. Saito, pp. 47-70. Plenum Press, New York, United States of America.

Raffa, K.F. & Priester, T.M. (1985) Synergists as research tools and control agents in agriculture. *J. Agric. Entomol.* 2, 27-45.

Rajakulendran, S.V. & Plapp, Jr.F.W. (1982) Synergism of five synthetic pyrethroids by chlordimeform against the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) and a predator, *Chrysopa carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Journal of Economic Entomology* 75, 1089-1092.

Roush, R.T. & Daly, J.C. (1990) The role of population genetics in resistance research and management. In *Pesticide resistance in arthropods*, ed. R. T. Roush & B. E. Tabashnik, pp. 97-152. Chapman and Hall, London, United Kingdom.

Samson, P.R., Parker, R.J. & Hall, E.A. (1990) Synergized deltamethrin as a protectant against *Sitophilus zeamais* Motsch. and *S. oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) on stored maize. *Journal of Stored Products Research* 26, 155-161.

- Scott, J.G. (1990) Investigating mechanisms of insecticide resistance: Methods, Strategies, and Pitfalls. In *Insecticide Resistance in Arthropods*, ed. R.T.Roush & B.E.Tabashnik, pp. 39-57. Chapman and Hall, London, United Kingdom.
- Subramanyam, B., Harein, P.K. & Cutkomp, L.K. (1989) Organophosphate resistance in adults of red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) and sawtoothed grain beetle (Coleoptera: Cucujidae) infesting barley stored on farms in Minnesota. *Journal of Economic Entomology* **82**, 989-995.
- Wilkinson, C.F. (1983) Role of mixed-function oxidases in insecticide resistance. In *Pest Resistance to Pesticides: Challenges and Prospects*, ed. G.P.Georgiou & T.Saito, pp. 175-205. Plenum Press, New York, United States of America.
- Williamson, M.S., Martinez-Torres, D., Foster, S.P., Schuler, T., Denholm, I. & Devonshire, A.L. (1997) Molecular genetic studies of knockdown (*kdr*) to pyrethroids. In *Resistance 97: Integrated Approach to Combating Resistance*, Anonymouspp. 16
- Yu, S.J. & Nguyen, S.N. (1992) Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in the diamondback moth. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **44**, 74-81.

CAPÍTULO 4

EXPRESSÃO DE RNA EM POPULAÇÕES RESISTENTES E SUSCETÍVEIS DE *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (COLEOPTERA: SILVANIDAE) EM RESPOSTA AO INSETICIDA FENITROTION

Resumo – Técnicas moleculares são ferramentas valiosas para explicar situações diversas envolvendo a resistência de insetos a inseticidas. Três populações de *Oryzaephilus surinamensis*: OS1 (suscetível), OS4 (moderadamente resistente) e OS10 (resistente) ao inseticida organofosforado fenitrotion foram selecionadas para o estudo de expressão diferencial de genes. A partir do RNA total extraído dos insetos, foram realizadas a síntese de cDNA (RT-PCR) e o isolamento de cDNAs expressados diferencialmente da população resistente OS10. Esses cDNAs foram sequenciados para investigação de similaridade com genes de resistência já depositados em banco de genes. As seqüências obtidas dos fragmentos apresentaram similaridade altamente significativa com o microorganismo *Bacteroides thetaiotaomicron*, gênero resistente a antibióticos, e com a enzima metionina aminopeptidase, que favorece a degradação de proteínas. As informações geradas pela aplicação da técnica molecular da expressão diferencial do RNA são importantes para relacionar com os resultados biológicos, e para estudos futuros da estrutura genética de populações de pragas, não somente quanto aos mecanismos envolvidos na resistência, mas também como ferramenta de detecção de genes relacionados para o manejo da resistência.

Palavras-chave - *Oryzaephilus surinamensis*, seqüência, DNA complementar, resistência, organofosforado

Abstract – Molecular techniques are useful tool to explain problems with insects resistant to insecticides. Three *Oryzaephilus surinamensis* strains: OS1 (susceptible), OS4 (moderately resistant) and OS10 (resistant) to the organophosphorous insecticide fenitrothion were studied to verify differential display of genes. The total RNA extracted from the insects was used for syntheses of cDNA (RT-PCR) and isolation of differentially expressed cDNAs from the resistant strain OS10. This cDNAs were sequenced to investigate resistant genes similarity from a genbank. The sequences obtained from fragments presented highly significant similarity with *Bacteroides thetaiotaomicron* microorganism, an antibiotic resistant type, and with metionine aminopeptidase enzyme, which promotes protein degradation. The generated informations by differential display of RNA method application are important to relate with biological results and to studies of the structure genetic of pest strains, to understand resistance mechanism involved and also as detection tool of related genes to resistance management.

Keywords - *Oryzaephilus surinamensis*, sequence, complement DNA, resistance, organophosphorus

4.1 Introdução

Os inseticidas organofosforados têm sido amplamente utilizados para controlar pragas de grãos armazenados, porém, seu uso intensivo tem levado ao desenvolvimento de resistência em muitas espécies de insetos, e em vários casos isto representa uma ameaça significativa para a continuidade de seu uso efetivo.

Populações de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) têm apresentado níveis de resistência aos organofosforados pirimifós-metil, malatíon, fenitrotíon e clorpirifós-metil (Collins, 1985; 1986; Conyers *et al.*, 1998) e, na maioria dos casos, tem sido difícil separar o efeito dos vários mecanismos de resistência e seus componentes e relacioná-los individualmente (Dauterman, 1983), já que, quando um único sistema não pode fornecer um nível de proteção eficiente, a resistência pode ser desenvolvida através de uma combinação de mecanismos (Lockwood *et al.*, 1984).

Em *O. surinamensis* a resistência metabólica é um importante mecanismo que confere resistência aos organofosforados, e é caracterizada por uma super-produção da enzima detoxificadora esterase, que degrada ou sequestra o inseticida (Conyers *et al.*, 1998). Considerando que a ação de muitos fatores de resistência vêm sendo elucidados, o conhecimento de sua origem e desenvolvimento é indispensável.

As mutações têm sido responsabilizadas pela origem da resistência, no entanto, segundo Oppenoorth (1984), comparações de seqüências de aminoácidos entre populações resistentes e suscetíveis são necessárias para validar essas informações. Trabalhos recentes relatam o seqüenciamento de genes tanto para estudos de filogenia de insetos (Howland & Hewitt, 1995), como também para estudos relacionados à resistência a inseticidas.

Em estudos de Conyers *et al.* (1998), com *O. surinamensis*, a enzima esterase de uma população suscetível e uma resistente a inseticidas organofosforados foi purificada

e seqüenciada. Os autores detectaram diferenças na seqüência de aminoácidos e sugeriram que as enzimas purificadas das duas populações podem ser diferentes.

Em um trabalho de revisão de Hemingway (2000), é mencionado que as esterases que conferem resistência, pelo aumento do metabolismo, ocorrem por mutações em genes estruturais, embora poucos tenham sido caracterizados ao nível de nucleotídeos. Tais mutações podem alterar significativamente a especificidade de substrato da enzima. Em *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) foi encontrada uma substituição do aminoácido glicina por asparagina no gene alfa da esterase, relacionada à resistência ao inseticida malatim.

Torres *et al.* (1997) investigaram a base molecular de resistência clonando a seqüência codificada do gene do canal de sódio tipo-para de *M. domestica*, que em razão de mutações de dois aminoácidos, leucina por fenilalanina, na região do segmento II S6 do canal de sódio, e de metionina por treonina na proximidade da ligação II S4 - II S5, é associado com os fenótipos de resistência “Knockdown” (*kdr*) e *super-kdr*, respectivamente, a inseticidas piretróides e DDT. Ampliando sua investigação, os autores não observaram essas mutações em seqüências do gene do canal de sódio de indivíduos suscetíveis de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera littoralis* Boisduvalle (Lepidoptera: Noctuidae), *Blattella germanica* L. (Blattaria: Blattidae), *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae), *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae), *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) e *Phorodon humuli* Schroeder (Hemiptera: Aphididae). Já, em testes com indivíduos de *P. xylostella* e *B. germanica* resistentes a piretróides, foi observada a mesma mutação, leucina por fenilalanina, como a descrita anteriormente em *M. domestica*. Em *Heliothis virescens*, no entanto, a mutação observada foi de leucina por histidina.

Martin *et al.* (2000) observaram em *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae) que o *kdr* é originado pela substituição de um aminoácido na região do segmento III S6 do canal de sódio, enquanto uma substituição de alanina por valina na proximidade da ligação III S4 – III S5 confere o aumento da resistência do *super kdr*.

Fournier *et al.* (1992) demonstraram que a acetilcolinesterase (AChE) alterada em uma população de *D. Melanogaster*, resistente ao inseticida malatim, ocorre devido a uma mutação, na qual a substituição de adenina por timina no gene da acetilcolinesterase resulta na substituição de fenilalanina por tirosina na posição 368. Mutero *et al.* (1992) constataram que a substituição de tirosina na posição 109 por outros resíduos também modifica a sensibilidade da acetilcolinesterase à inibição por carbamatos e organofosforados.

O afídeo *Myzus persicae* (Sulz) (Hemiptera: Aphididae) pode apresentar resistência a uma série de inseticidas através de uma super produção de esterase, além de possuir formas mutantes insensíveis de acetilcolinesterase e do canal de sódio. Estudos de Field *et al.* (1997), usando uma combinação de bioensaios e testes bioquímicos e de DNA, possibilitaram diagnosticar os três mecanismos de resistência. Um estudo com 46 clones resistentes apresentou genes de esterase amplificados, conferindo largo espectro de resistência a piretróides, organofosforados e carbamatos. Estes genes ocorreram em combinação com acetilcolinesterase insensível, conferindo resistência ao pirimicarb e triazamato e ou, genes mutantes do canal de sódio, conferindo resistência *kdr* a piretróides e DDT.

A agroevolução, devido à pressão de seleção com inseticidas através de várias estratégias de manejo, oferece vários exemplos dos extremos em adaptação que um organismo pode obter, tornando a compreensão dos diferentes aspectos que caracterizam a resistência necessária (Via, 1986). A investigação destes aspectos requer

uma compreensão da estrutura genética das populações de pragas através de metodologias moleculares específicas (Brown *et al.*, 1997).

As células expressam em torno de 15.000 genes e, a princípio, cada molécula de mRNA pode ser transcrita reversamente pela “reverse transcription polymerase chain reaction” (RT-PCR). A expressão diferencial do RNA (differential display” of RNA – DD-RNA) (Liang & Pardee, 1992) é uma técnica utilizada com o propósito de identificar a expressão diferencial de genes de diversos sistemas eucariontes. Os fragmentos (cDNAs) são amplificados pela PCR e resolvidos em gel de sequenciamento para a verificação de genes expressos diferencialmente. É uma tecnologia de “fingerprinting” que facilita a identificação de mRNAs nas células ou tecidos, sendo útil para a identificação de alterações de funções das células resultantes de diferenças na transcrição ou na degradação do mRNA.

Na busca por alternativas de controle de *O. surinamensis*, o conhecimento da interação inseto-inseticida em nível molecular pode contribuir para a compreensão dos mecanismos pelos quais os produtos gênicos são transcritos, suas prováveis funções, e o conhecimento de seqüências no genoma do inseto que modulam sua expressão pode levar a novas estratégias para o controle dessa espécie.

O objetivo deste estudo foi descrever a clonagem e sequenciamento de fragmentos de cDNAs expressos diferencialmente de uma população de *O. surinamensis* resistente ao organofosforado fenitrotiom.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Populações de *O. surinamensis* e bioensaio de resistência

Para o estudo da expressão diferencial de genes, foram selecionadas três populações de *O. surinamensis*: OS1 (suscetível), OS4 (moderadamente resistente) e

OS10 (resistente) ao inseticida organofosforado fenitrotiom 500 g i.a./L (Sumigran 500 CE).

Foram utilizados indivíduos adultos, não sexados, mantidos em grãos de trigo triturados ao grau 20, conforme descrito no Capítulo 1, item 1.2.2. Nas populações OS1 e OS4, os insetos foram da décima geração (F_{n+10}) e os da OS10 foram coletados a campo (F^0).

Para a composição das amostras, realizou-se um bioensaio onde as populações foram submetidas a um tratamento com fenitrotiom, baseando-se na CL_{50} de cada população, previamente determinada no Capítulo 2, item 2.3, além de um controle sem tratamento. O inseticida fenitrotiom foi diluído em éter de petróleo para a obtenção das concentrações requeridas; 1,0 mL da concentração foi distribuído sobre o papel filtro de 9 cm de diâmetro em placas de Petri, em quatro repetições para cada população. Após a evaporação do solvente, 10 insetos adultos foram liberados no interior de cada placa e após 1, 6 e 24 horas da infestação, esses indivíduos foram imersos em nitrogênio líquido, macerados e armazenados a -80°C até o momento dos testes.

O experimento foi mantido em sala climatizada, à temperatura de $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar de $65 \pm 5\%$.

4.2.2 Isolamento do RNA total

O isolamento do RNA total baseou-se na metodologia descrita em Lângaro (2002) adaptada de Liang & Pardee (1992). À amostra macerada (100-200 mg) foram acrescentados 400 μL de solução de extração [100 mM Tris-HCl pH 9,0; 200 mM NaCl; 15 mM EDTA (ácido etileno diamino tetra acético) e 0,5% SDS, sódio dodecil sulfato]; 2,3 μL de β -mercaptoetanol; 400 μL de fenol e 80 μL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). A mistura foi homogeneizada por 2 min em um agitador de tubos tipo

vórtex. A seguir, acrescentou-se 28 µL de acetato de sódio 3M (pH 5,2), agitando-se por 1 min em vórtex, seguido de incubação por 15 min. As amostras foram centrifugadas a 4°C, sob 13.000 g, por 10 min. Após, foram adicionados à fase aquosa 400 µL de fenol e 80 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), homogeneizando-se por 2 min e centrifugando-a a 13.000 g, por 5 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, adicionando-se aproximadamente 500 µL (1 v) de isopropanol, deixando-se por 1 h a –20°C e, após, centrifugada a 10.000 g por 10 min. A seguir, foi acrescentado 1 v de etanol 70% ao precipitado, centrifugando-se a 10.000 g por 5 min. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado incubado em temperatura ambiente por aproximadamente 10 min. O precipitado foi solubilizado em 90 µL de água ultrapura (Millipore – Direct-Q™), acrescido de 30 µL de LiCl₂ (8M), incubando-se por 3 h no gelo; após, os tubos foram centrifugados a 14.000 g, por 10 min. Acrescentou-se ao precipitado 1 v de etanol (70%), centrifugando-se a 10.000 g, por 5 min; após, o sobrenadante foi descartado, deixando-se o RNA precipitado em temperatura ambiente por aproximadamente 10 min. O RNA foi, então, solubilizado em 50 µL de água, incubado em temperatura ambiente por 10 min e armazenado a –20°C até ser utilizado. Finalmente, o RNA foi quantificado, avaliado para a sua qualidade em espectrofotômetro e resolvido em gel de agarose.

4.2.3 Testes de RNA

Para se obter os fragmentos diferenciais do RNA (differential display) utilizou-se o protocolo descrito por Averboukh *et al.* (1996), adaptado por Lângaro (2002).

4.2.3.1 Transcrição reversa de RNA-PCR

Os RNAs isolados de *O. surinamensis* foram submetidos à técnica da transcrição reversa de RNA, seguida da amplificação de fragmentos dos DNAs complementares (cDNA) (RT-PCR), utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores (primers): oligo 1(dTC), 5' AAG CTT TTT TTT C 3' e oligo 2 (dTG), 5' AAG CTT TTT TTT TTT G 3'.

O volume da reação RT totalizou 5 µL : 2 µL de RNA (0,2 µg), 6,6 mM de DTT (“ditiotretitol”, Gibco); 1 µL tampão [estoque 5x: 100 mM Tris-HCl (pH 9,0), 200 mM NaCl, 15 mM EDTA, 0,5% Sarkosyl (Gibco)]; 1,32 µM oligo (dTC) (Gibco); 340 µM de dNTPs (Gibco); 6,8 U de transcriptase reversa (M-MLV, Gibco) e água para completar o volume. A reação foi incubada a 37°C por 1 h em termociclador PT-100™ (“Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc.”).

Para a PCR, o volume totalizou 25 µL: 5 µL de reação RT (cDNA), tampão 1x [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl] (Gibco); 2 mM MgCl₂; 200 µM de mistura de dNTPs; 0,8 µM de cada “primer”; 1,5 U Taq polimerase (Gibco). As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 95°C, 2 min; 39 ciclos de desnaturação a 94°C, 30 s; anelamento 40°C, 2 min e extensão 72°C, 1 min 30 s; e extensão final 72°C, 5 min.

4.2.3.2 Eletroforese dos produtos de RT-PCR

Para a RT-PCR, foram selecionadas as combinações de oligonucleotídeos iniciadores oligo 1 – oligo 2, conforme Lângaro (2002).

Para a separação de produtos de RT-PCR, realizou-se a reação do “differential display”, na qual foram resolvidas as amostras de cDNAs. O gel de acrilamida a 6% foi preparado conforme descrito em PROMEGA (1993) e permaneceu a 50 W (pré-corrida) até sua temperatura estabilizar em 45°C. Os cDNAs foram previamente

incubados a 70°C por 2 minutos e resolvidos no gel por aproximadamente 3 h e 30 min. O peso molecular foi comparado ao padrão 1 Kb (Biogen). Após a resolução das amostras, o gel foi tratado com coloração prata (Silver SequenceTM, (PROMEGA, 1993) e a seguir fotografado (Kodak Digital Science 1 DTM).

4.2.4 Extração e amplificação de produtos de RT-PCR

Os cDNAs expressados diferencialmente foram isolados do gel utilizando-se a técnica de excisão de bandas baseada na PCR (Wilton *et al.*, 1999), nas mesmas condições anteriormente descritas, exceto na redução da temperatura de anelamento de 40 para 35°C.

4.2.5 Clonagem, isolamento de plasmídeo e seqüenciamento

Para a clonagem utilizou-se os cDNAs excisados do gel e amplificados pela PCR em uma reação de ligação com vetor topo TA[®], seguida da transformação em células de *Escherichia coli* (Invitrogen, 2001). O DNA plasmidial foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Brasileiro & Carneiro (1998). O ciclo do seqüenciamento dos fragmentos amplificados pelos iniciadores oligo 1 e oligo 2, foi feito por meio de PCR utilizando o kit de reação ABI PRISM[®] “Big Dye TerminatorTM Cycle Sequencing Ready” (Applied Biosystems), e os primers do vetor M13 “forward e reverse”. As condições da PCR foram: desnaturação 96°C, 20 min; anelamento 50°C, 15 min; extensão 60°C, 4 min; 35 ciclos, e posteriormente foi feita a purificação do produto amplificado por precipitação com isopropanol. Os dados seqüenciados foram coletados e analisados usando o seqüenciador ABI Prism[®] 3100 “Genetic Analyzer” (Applied Biosystems). As seqüências foram alinhadas e comparadas com auxílio do software DNA Star – “Module SeqMan contained in the program Lasergene” (DNASTAR, Inc.)

e, posteriormente comparadas às seqüências de outras espécies depositadas em banco de genes (GenBank) para identificação de similaridade com genes de resistência.

4.3 Resultados e Discussão

O padrão de expressão de fragmentos de cDNA foi verificado em uma reação de “differential display”, representada pela figura 1.

Após a eletroforese em gel de acrilamida, selecionou-se os cDNAs acumulados diferencialmente quanto à exposição ao inseticida fenitrotiom e, a interação diferencial entre os genótipos do inseto e CLS₅₀ do inseticida nos tratamentos, foi evidenciada pela presença ou ausência de fragmentos no gel.

Na reação de “differential display”, na qual foram resolvidas as amostras de RT-PCR obtidas a partir da extração de RNA, foi observado um maior acúmulo de RNA a 1, 6 e 24 h após a infestação, com exposição ou não ao inseticida, na população de *O. surinamensis* resistente ao fenitrotiom (OS10). Foram selecionados dois cDNAs expressos diferencialmente: Banda 2 e Banda 4 (Figura 1), extraídos do gel e reamplificados conforme descrito na metodologia (Wilton *et al.*, 1999). O tamanho dos fragmentos de cDNA isolados do gel variou entre 150 e 300 pb.

Para as etapas de transformação, clonagem e extração do plasmídeo, utilizou-se 4 repetições para cada cDNA, sendo que somente na repetição 2.4C (Banda 2) e nas repetições 4.3C, 4.3D e 4.3E (Banda 4), o DNA plasmidial foi visualizado em gel de agarose 0,8% (Figura 2).

Foram obtidas as seqüências parciais de 2.4C, 4.3C, 4.3D e 4.3E (redundante) (Tabela 1), as quais foram comparadas com seqüências depositadas no banco de dados do Genbank (National Center for Biotechnology Information, 2003). As seqüências expressas na interação *O. surinamensis* – fenitrotiom foram comparadas com as

seqüências de genes disponibilizadas no referido banco de dados, utilizando-se a ferramenta BLAST (Altschul *et al.*, 1990), pela qual se obtém, entre outras informações, a similaridade “*T*” (Tabela 2) entre as seqüências e o valor “*E*”, parâmetro que descreve o número de vezes que uma seqüência em particular pode ser encontrada em um banco de dados. A identidade entre as seqüências foi separada de acordo com o valor “*E*” em significativa ($E \geq e^{-19}$) e moderadamente significativa ($e^{-3} \leq E \leq e^{-19}$) (Kim *et al.*, 2001).

A seqüência parcial do cDNA 2.4C não mostrou homologia significativa com seqüências depositadas no banco de dados do GenBank, e pode ser parte de um gene desconhecido. Esta seqüência e outras que poderão ser obtidas em trabalhos posteriores com este inseto, deverão ser testadas em uma biblioteca mais ampla de cDNAs, com o intuito de validar a relação de resistência ao tratamento.

As seqüências dos cDNAs 4.3C e 4.3D apresentaram mais de cem alinhamentos significativos com seqüências depositadas no banco de dados do GenBank.

Constatou-se similaridade altamente significativa do cDNA 4.3C expressado na interação de *O. surinamensis* – fenitrotiom com cDNAs de rRNA dos microorganismos *Myroides odoratus*, *Chlorobium limicola*, *Streptococcus oralis* e *Bacteroides caccae* 23S (acessos M62807, $e = -24$; M62805, $e = -20$; X68427, $e = -17$ e AY155590, $e = -15$) (Tabela 2). Da mesma forma, no resultado de comparação de seqüências do cDNA 4.3D, verificou-se alta homologia ao microorganismo *Bacteroides thetaiotaomicron* e à enzima metionina aminopeptidase deste mesmo microorganismo (acessos AE016937, $e = -22$ e NP811618, $e = -19$), assim como também de outros microorganismos (Tabela 2).

O genoma da bactéria anaeróbica gram-negativa *B. thetaiotaomicron*, membro dominante do intestino humano, foi recentemente seqüenciado (Xu *et al.*, 2003). Os bacteróides estão entre os anaeróbios mais resistentes a antibióticos. Seus conhecidos

genes de resistência a antibióticos incluem *TetQ*, que altera o ribossomo alvo para tetraciclina; *ErmF*, relacionado a N-metiltransferase do rRNA, um modificador do rRNA que origina resistência a eritromicina e, falosporinasas as quais hidrolisam cefalosporinas. *B. thaitaomicron* contém 60 proteínas componentes do sistema de efluxo de drogas, sendo este possivelmente o principal mecanismo de resistência a antibióticos neste microorganismo. Considerando-se essas constatações e a homologia altamente significativa de seqüências parciais de cDNAs de uma população de *O. surinamensis* resistente ao fenitrotiom com *B. thaitaomicron*, sugere-se estudos posteriores a fim de investigar algum possível mecanismo de resistência vinculado às duas espécies.

A alta homologia com a enzima metionina aminopeptidase de microorganismos foi outro resultado expressivo encontrado ($e = -19$) (Tabela 2). Esta enzima pertence à classe das hidrolases, e sua principal função é remover a metionina amino-terminal (N-terminal) de proteínas recém-formadas (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, 2003). As proteínas inicialmente sintetizadas contêm metionina como seu primeiro aminoácido (N-terminal). Esta característica tem uma importante influência sobre a estabilidade da proteína, que freqüentemente resiste a hidrólises porque apresenta a região N-terminal quimicamente modificada (geralmente acetilação), desempenhando desta forma um importante papel na proteção contra a degradação (Alberts *et al.*, 1994). Segundo estes autores, há uma forte relação entre a meia-vida *in vivo* de uma proteína e a identidade de seu aminoácido N-terminal. Os aminoácidos metionina, serina, treonina, alanina, valina, cisteína, glicina ou prolina, por exemplo, protegem proteínas em *Saccharomyces cerevisiae*, quando presente na posição N-terminal; estes aminoácidos não são reconhecidos por componentes alvos da rota N-terminal, enquanto os doze aminoácidos restantes atraem um ataque proteolítico.

As informações obtidas sobre a função da enzima metionina aminopeptidase já são bastante expressivas, contudo, estudos relacionando o possível envolvimento dessa enzima com respostas de defesa do inseto ainda são necessários.

Sugere-se correlacionar a expressão diferencial dos cDNAs de *O. surinamensis* isolados neste trabalho com a resistência a inseticidas, utilizando técnicas como “*Northern Blot*” (Guerrero, 2000) ou “*Macroarray*” (Nogueira *et al.*, 2003).

A técnica “*Northern blot*” possibilita imobilizar e marcar o cDNA conhecido (sonda molecular) em membranas de nylon ou nitrocelulose. A sonda poderá ser marcada com isótopos radioativos (P32 ou S35), substâncias fluorescentes (fluoresceína), ou com enzimas (geralmente peroxidases), e hibridizará especificamente com a sua cadeia complementar em uma biblioteca de cDNAs, confirmando o cDNA anteriormente isolado (Guerrero, 2000).

A técnica “*macroarray*” assemelha-se ao “*northern blot*”, entretanto, possibilita a identificação de um número significativamente maior de fragmentos de cDNAs através de sondas específicas, e também verifica a intensidade do sinal derivado da sonda hibridizada (Nogueira *et al.*, 2003).

Na última década, grandes avanços na compreensão da base molecular de resistência a inseticidas foram observados. Genes estruturais que codificam enzimas que ocorrem em grande quantidade em várias espécies de insetos, têm sido clonados e caracterizados. A compreensão de como esses genes são regulados será outro grande avanço para o esclarecimento de tais sistemas, possibilitando manipular espécies de insetos-praga a fim de restaurar sua suscetibilidade aos inseticidas (Hemingway, 2000).

Esta pesquisa é pioneira na área de resistência a inseticidas em pragas de grãos armazenados, associando a interação espécie praga–inseticida. Ainda que os dados obtidos não sejam conclusivos, as seqüências expressadas podem, ao menos em parte,

representar os processos moleculares que ocorrem durante a interação *O. surinamensis* – fenitrotiom e, contribuir para estudos futuros que abordem a estrutura genética de populações praga com o intuito de desenvolver novas estratégias de controle.

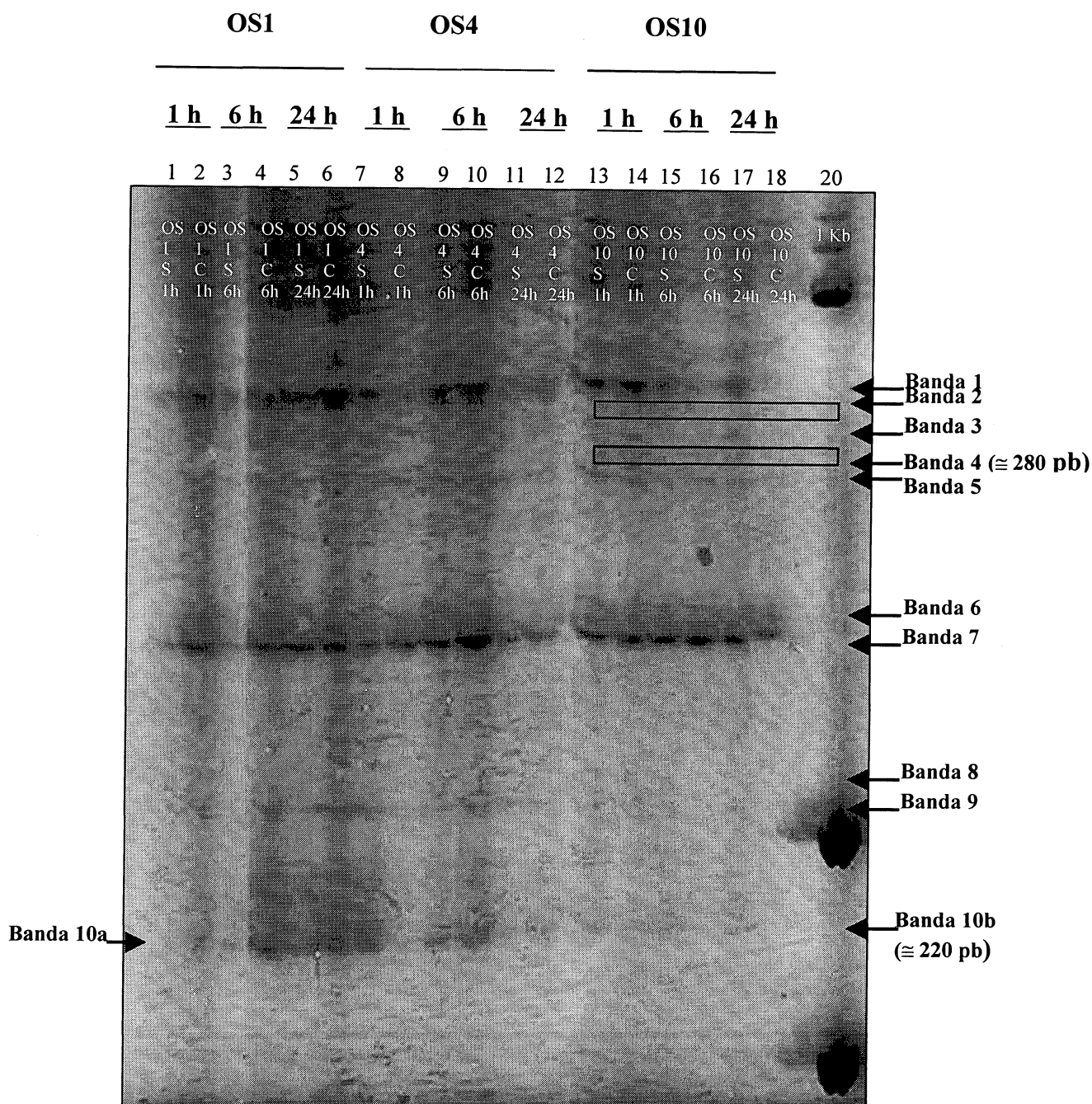


Figura 1 Padrões de cDNAs derivados de genótipos de *Oryzaephilus surinamensis* não expostos (s) e expostos (c) ao inseticida organofosforado fenitrotiom, usando a técnica de RT-PCR, “primers” da PCR – oligo 1 – oligo 2, resolvidos em gel de acrilamida 6 %. Canaletas 1-6: OS1 (suscetível); 7-12: OS4 (moderadamente resistente); 13-18 OS10 (resistente) 1, 6 e 24 h após a infestação. Canaleta 20: ladder 1Kb. Passo Fundo, RS, 2003.

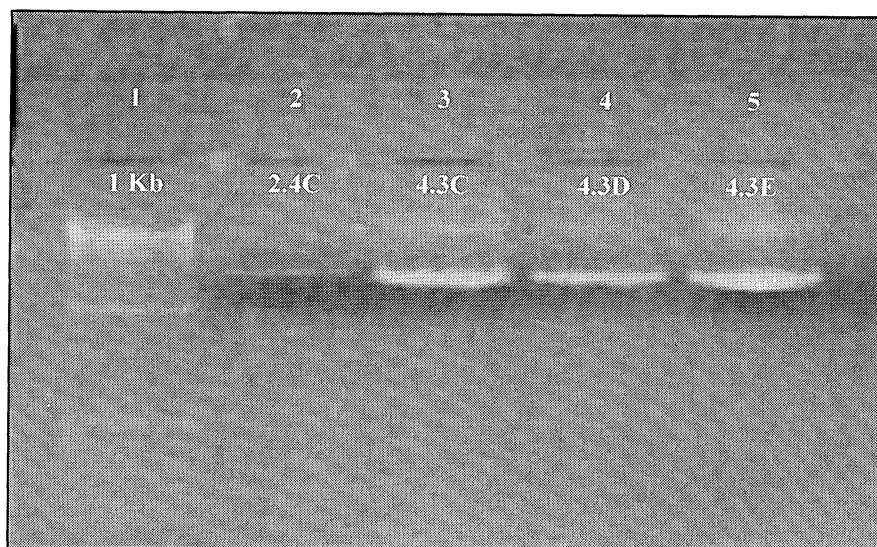


Figura 2 Padrões de DNA plasmidial contendo o inserto de cDNAs expressados diferencialmente da população de *Oryzaephilus surinamensis* resistente ao inseticida fenitrotiom (OS10), resolvidos em gel de agarose 0,8%. Canaleta 1 – Ladder 1 Kb; 2 - fragmento 2.4C; 3 – 4.3C; 4 – 4.3D; 5 – 4.3E. Passo Fundo, RS, 2003.

Tabela 1 Sequências parciais de nucleotídeos de fragmentos de cDNAs isolados de uma população resistente de *Oryzaephilus surinamensis* (OS10) exposta ao inseticida fenitrotiom. Passo Fundo, RS, 2003.

cDNA	Sequências Consenso
2.4C (292pb)	<p>TTTCCA TGACA TACAAA</p> <p>TAAAGTACAATATGAAAGTTTACAATTTTCCTTTTCATTATATTGGATTATAATACGTA</p> <p>GTATCG ATTACT TTGTTT</p> <p>AAGAAAAATTAAACAAATGATAGACAATATACTTTGGCCTAATAAGTGCAAAAAAAG</p> <p>TGTTCCGAC TTACAA</p>
4.3C (277pb)	<p>TTTTTTTTTGCATAGACAGCTAGGATGTTAGCTTGAAGCAGCTATCATTTAAAGAGTG</p> <p>CGTAAAAGCTCACTAGTCAAGCGATTAAGCGTGGATAATAATCGGGCATTAAGTATATC</p> <p>GCCGAAACTATGGGATTTATTTTAAATCGGTAGGGGAGCATTGTAATTACGTAGAATCT</p> <p>ATATTGTGAAATATAGTGGAGTATTTACAAAAGAAAATGTAGGTATAAGTAACGATAAT</p> <p>ACAGATGTAAAATCTGTACACCGAAAAAAGCTTA</p>
4.3D (238pb)	<p>TTTTTTTTTCCATAATTAGGAATCATAGGTTCTTCATGAATCTTTCTTCCTATACCATGAC</p> <p>CAACAAATTCTTTTACAATACTATATCCTTTTGACTCAATATAATTTTGTATAAAAAATCC</p> <p>TATATCACCTATTTTATTTCCATTTTACAATTAGAAATTCCTATATATAAAGAATTTTTA</p> <p>ACTATTTGAATAAATTTATTAATTTTAGGATCATCTCCCAAAAAAAGCTTA</p>

Tabela 2 Fragmentos de cDNAs isolados de uma população resistente de *Oryzaephilus surinamensis* (OS10) exposta ao inseticida fenitrotiom, e sua similaridade com seqüências disponibilizadas em banco de genes (GenBank). Passo Fundo, RS, 2003.

SE	Acesso	Fonte (cDNA)	I	Blast ^e
4.3.C	M62807	rRNA - <i>Myroides odoratus</i>	88/96	3e-24
	AE016937	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482	107/122	4e-23
	AE012963	<i>Chlorobium tepidum</i> TLS	83/92	6e-22
	M62805	rRNA <i>Chlorobium limicola</i>	78/86	1e-20
	X68427	rRNA <i>Streptococcus oralis</i>	60/64	4e-17
	AY155590	rRNA - <i>Bacteroides caccae</i> 23S	78/89	2e-15
	AE017179	<i>Porphyromonas gingivalis</i> W83	61/65	2e-15
	AC025592	<i>Staphylococcus aureus</i>	59/64	9e-15
	AF269416	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	59/64	9e-15
4.3.D	AE016937	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	54/71	2e-22
	AE016953	<i>Enterococcus faecalis</i> V583	54/69	1e-21
	AE017178	<i>Porphyromonas gingivalis</i> W83	51/69	4e-19
	AE006294	<i>Lactococcus lactis</i>	49/68	5e-19
	NP811618	Metionina aminopeptidase <i>B. thetaiotaomicron</i>	58/77	4e-19
	AE008472	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	47/67	4e-18
	AAO81932	Metionina aminopeptidase <i>E. faecalis</i> V583	54/69	3e-18
	AE017029	<i>Bacillus anthracis</i>	51/66	8e-17
	EAA24143	Metionina aminopeptidase <i>Fusobacterium nucleatum</i>	55/77	3e-16
	AAQ66898	Metionina aminopeptidase <i>P. gingivalis</i> W83	51/69	3e-16
	AAK04710	Metionina aminopeptidase <i>Lactococcus lactis</i>	49/68	4e-16
	AAK99796	Metionina aminopeptidase <i>Streptococcus pneumoniae</i>	47/67	2e-15
	AAP25525	Metionina aminopeptidase <i>B. anthracis</i>	51/66	3e-14
	AAO37039	Metionina aminopeptidase <i>Clostridium tetani</i>	44/65	4e-13

SE – seqüências expressadas (cDNAs) na interação da população resistente de *O. surinamensis* (OS10) – inseticida fenitrotiom

I – similaridade de seqüências expressadas na interação da população resistente de *O. surinamensis* (OS10) – inseticida fenitrotiom com seqüências de genes disponibilizadas no GenBank

e – valor E: parâmetro que descreve o número esperado de vezes que uma seqüência particular pode ser encontrada em um banco de dados. Significante ($E \geq e^{-19}$) e moderadamente significativa ($e^{-3} \leq E \leq e^{-19}$).

4.4 Referências Bibliográficas

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J.D. (1994) Protein Function. In *Molecular Biology of The Cell*, ed. B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & J. D. Watson, pp. 195-222. Garland Publishing, Inc., New York, USA.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal Molecular Biology* **215**, 403-410.
- Averboukh, L., Douglas, S.A., Zhao, S., Lowe, K., Maher, J. & Pardee, A.B. (1996) Better gel resolution and longer cDNAs increase precision of differential display. *BioTechniques* **20**, 918-921.
- Brasileiro, A.C.M. & Carneiro, V.T.d.C. (1998) *Manual de Transformação Genética de Plantas*. 309 pp. Embrapa-Cenargen. Brasília.
- Brown, R.J., Malcolm, C.A., Mason, P.L. & Nichols, R.A. (1997) Genetic differentiation between and within strains of the saw-toothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) at RAPD loci. *Insect Molecular Biology* **6**, 285-289.
- Collins, P.J. (1985) Resistance to grain protectants in field populations of the sawtoothed grain beetle in Southern Queensland. *Aust. J. Exp. Agric.* **25**, 683-686.

- Collins, P.J. (1986) Genetic analysis of fenitrothion resistance in the sawtoothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Cucujidae). *Journal of Economic Entomology* **79**, 1196-1199.
- Conyers, C.M., MacNicoll, A.D. & Price, N.R. (1998) Purification and characterisation of an esterase involved in resistance to organophosphorus insecticides in the sawtoothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 435-448.
- Dauterman, W.C. (1983) Role of hydrolases and glutathione s-transferases in insecticide resistance. In *Pest Resistance to Pesticides: Challenges and Prospects*, ed. G.P.Georgiou & T.Saito, pp. 229-247. Plenum Press, New York, United States of America.
- Field, L.M., Anderson, A.P., Denholm, I., Foster, S.P., Harling, Z.K., Javed, N., Torres, D.M., Moores, G.D., Williamson, M.S. & Devonshire, A.L. (1997) Use of biochemical and DNA diagnostics for characterising multiple mechanisms of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pesticide Science* **51**, 283-289.
- Fournier, D., Bride, J.-M., Hoffmann, F. & Karch, F. (1992) Acetylcholinesterase - two types of modifications confer resistance to insecticide. *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 14270-14274.

- Guerrero, F.D. (2000) Cloning of a horn fly cDNA, *Hia E7*, encoding as esterase whose transcript concentration is elevated in diazinon-resistant flies. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**, 1107-1115.
- Hemingway, J. (2000) The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**, 1009-1015.
- Howland, D.E. & Hewitt, G.M. (1995) Phylogeny of the Coleoptera based on mitochondrial cytochrome oxidase I sequence data. *Insect Molecular Biology* **4**, 203-215.
- Invitrogen (2001) *TOPO TA Cloning Kit for Sequencing: version H*, 072701, 25-0276. 25 pp. Carlsbad.
- Kim, S., Ahn, I.-P. & Lee, Y.-H. (2001) Analysis of genes expressed during rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Molecular Plant Microbe Interactions*, St. Paul **14**, 1340-1346.
- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (2003) Disponível em: <<http://www.kegg.com>>. Acesso em: 25 out. 2003
- Lângaro, N.C. (2002) Caracterização biológica e molecular da interação de *Drechslera avenae* (Eidam) Sharif com cultivares e linhagens de aveia (*Avena sativa* L.). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 73p.

- Liang, P. & Pardee, A.B. (1992) Differential display of eukariotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967-971.
- Lockwood, J.A., Sparks, T.C. & Story, R.N. (1984) Evolution of insect resistance to insecticides: a reevaluation of the roles of physiology and behavior. *Bulletin of the Entomological Society of America* **41**, 41-50.
- Martin, R.L., Pittendrigh, B., Liu, J., Reenan, R., French-Constant, R. & Hanck, D.A. (2000) Point mutations in domain III of a *Drosophila* neuronal Na channel confer resistance to allethrin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**, 1051-1059.
- Mutero, A., Pralavario, M., Simeon, V. & Fournier, D. (1992) Catalytic properties of cholinesterases: importance of tyrosine 109 in *Drosophila* protein. *NeuroReport* **3**, 39-42.
- National Center for Biotechnology Information (2003) Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 10 set. 2003
- Nogueira, F.T.S., Rosa Jr, V.E.d., Menossi, M., Ulian, E.C. & Arruda, P. (2003) RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. *Plant Physiology* **132**, 1811-1824.
- Oppenoorth, F.J. (1984) Biochemistry of insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **22**, 187-193.

- PROMEGA (1993) *Technical Manual: Silver SequenceTM, DNA Sequencing System*. [S.I.]. 18 pp.
- Torres, D.M., Devonshire, A.L. & Williamson, M.S. (1997) Molecular studies of knockdown resistance to pyrethroids: cloning of domain II sodium channel gene sequences from insects. *Pesticide Science* **51**, 265-270.
- Via, S. (1986) Quantitative genetic models and the evolution of pesticide resistance. In *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management*, ed. National Research Council, pp. 222-235. National Academy Press, Washington, United States of America.
- Wilton, S.D., Lim, L., Dyem D., Laing, N. (1999) Bandstab: a PCR-based alternative to cloning PCR products. In *Expression Genetics: Differential Display*, ed. A. B. Pardee & M. McClelland, pp. 371-375. Eaton Publishing, San Diego.
- Xu, J., Bjursell, M.K., Himrod, J., Deng, S., Carmichael, L.K., Chiang, H.C., Hooper, L.V. & Gordon, J.I. (2003) A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis. *Science* **299**, 2074-2076.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espécie *O. surinamensis* vem apresentando, em armazéns de diversas regiões do País, indícios de resistência a inseticidas. Entretanto, para se proceder às investigações necessárias, um dos primeiros requisitos é a disponibilidade de grandes quantidades de insetos, durante todo o ano. Desta forma, a pesquisa desenvolvida aqui representa uma importante contribuição metodológica para estudos que envolvam a criação massal deste coleóptero.

A aplicação da metodologia de criação de *O. surinamensis* estabelecida aqui possibilitou, além da obtenção de um grande número de indivíduos, o conhecimento detalhado de seu ciclo biológico, o que permitiu a padronização da idade dos adultos para os testes de resistência da espécie aos inseticidas químicos usados na proteção de grãos armazenados. Com base nos dados sobre a longevidade dos adultos, foi possível estabelecer o número médio de dias que essa espécie pode sobreviver em grãos com diferentes graus de trituração, informação esta importante também para o manejo dos lotes de grãos em função dos danos mecânicos apresentados. A adoção de medidas como a regulação correta das máquinas colhedoras às diferentes cultivares de trigo, além da pré-limpeza rigorosa dos grãos no momento do armazenamento, são estratégias que podem reduzir a quantidade de grãos quebrados, minimizando o problema de infestação por *O. surinamensis*, além, evidentemente, de auxiliar no controle efetivo das outras pragas.

Os níveis de resistência registrados pela primeira vez no Brasil para a maioria das populações de *O. surinamensis* testadas com os inseticidas organofosforados e piretróides eram esperados, considerando as falhas de controle que esta espécie vem apresentando e ao histórico de aplicação de inseticidas nas diversas unidades

armazenadoras. Os indivíduos da população suscetível OS1 foram coletados em uma unidade armazenadora onde os grãos receberam apenas tratamento com expurgo e, portanto, apresentaram o menor valor da CL_{50} . Entretanto, as populações OS2, OS3, OS4 e OS5, como o histórico já indicava, eram submetidas a uma intensa pressão de seleção por químicos, mas foram mantidas em laboratório sem pressão de seleção por inseticidas por várias gerações, e ainda assim apresentaram níveis de resistência. As populações OS6, OS7, OS9, OS10, OS11 e OS12 foram testadas logo após a coleta nas unidades armazenadoras, e apresentaram fatores de resistência mais elevados, tendo a OS10 apresentado o maior nível de resistência aos dois grupos de inseticidas. Esses resultados mostram que o uso de inseticidas para controlar pragas em grãos armazenados precisa ser cuidadosamente gerenciado nos programas de manejo da resistência.

O valor do coeficiente angular, observado na análise dos bioensaios em todas as populações, indica uma heterogeneidade desses indivíduos aos inseticidas testados, sugerindo que há um grande potencial para o desenvolvimento de níveis maiores de resistência com a continuidade de pressão de seleção. A velocidade com que uma população-praga pode aumentar sua resistência a um inseticida é um importante aspecto a ser considerado em programas de manejo da resistência. Mais estudos são necessários para verificar o potencial de desenvolvimento de resistência em *O. surinamensis*.

Como o PBO sinergizou o inseticida deltametrina neste experimento, e já que o mesmo, conhecidamente, bloqueia oxidases multifuncionais (MFO), é possível inferir que essas enzimas exercem uma importante função na resistência à deltametrina nas populações de *O. surinamensis* avaliadas. Entretanto, como a resistência não foi completamente suprimida, deduz-se que outro mecanismo de resistência, além do metabolismo por oxidases, possa também estar envolvido com essa espécie. Estudos

complementares devem ser desenvolvidos para investigar outros possíveis mecanismos de resistência de *O. surinamensis* à deltametrina. Sugere-se, também estudos com o sinergista DEF que apresenta um forte efeito inibitório sobre esterases, a fim de investigar o potencial destas enzimas na detoxificação de inseticidas organofosforados em *O. surinamensis*.

Com os resultados obtidos através do estudo molecular, que constatou a expressão diferencial de genes entre populações suscetível e resistente de *O. surinamensis*, pode-se inferir que há uma adaptação genética nos indivíduos resistentes ao inseticida fenitrotiom. Esta constatação é reforçada pelo seqüenciamento dos fragmentos diferencialmente expressos na população resistente OS10, cujo resultado indicou uma homologia bastante significativa com o microorganismo *Bacteroides thetaiotaomicron*, o qual é altamente resistente a antibióticos e, à enzima metionina aminopeptidase, que pertence à classe das hidrolases, que conhecidamente detoxificam inseticidas. Contudo, esses estudos moleculares devem ser continuados, pois podem identificar genes de resistência em insetos, possibilitando futuras manipulações dos mesmos. O uso de técnicas bioquímicas e moleculares em programas de manejo da resistência, se amplamente utilizadas, apresentam enorme potencial para esclarecer os mecanismos envolvidos no processo, contribuindo para o desenvolvimento de moléculas mais adequadas para a proteção de produtos armazenados contra o ataque das pragas.

ANEXO

**Protocolo para a multiplicação de *Oryzaephilus surinamensis* (L.)
(Coleoptera: Silvanidae), em laboratório.**

Seguindo-se o protocolo de multiplicação de *O. surinamensis* descrito a seguir, é possível a obtenção de um número significativo de insetos dentro de um período de desenvolvimento e com taxas reprodutiva e de sobrevivência satisfatórios para diversos estudos.

1. Condições para a criação: sala climatizada à temperatura de $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar de $65 \pm 5\%$;
2. Esterilizar quatro frascos de vidro para cada população submetida à multiplicação;
3. Preencher cada frasco com aproximadamente 80 g de grãos de trigo, limpos e secos, triturados ao grau 20 (Aparelho Buhler-Miag, modelo MLI 204), previamente esterilizados em estufa a 60°C por uma hora;
4. Liberar cerca de 100 insetos adultos em cada frasco para ovipositar por 10 dias;
5. Cobrir os frascos com papel filtro e vedar com massa para calafetar;
6. Remover os adultos dos frascos após os 10 dias do período de oviposição;
7. Os primeiros adultos da progênie emergirão, em média, após 30 dias, e em 46 dias pode-se obter toda a progênie, que poderá apresentar uma longevidade de até 450 dias;
8. Para a repicagem das próximas gerações o mesmo procedimento deverá ser seguido.